

Einfluss eines spinal applizierten IKK-Inhibitors  
auf die entzündungsbedingte Übererregbarkeit  
nozizeptiver Rückenmarkneurone

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Melanie Gassen  
(geb. Buchmann)  
geboren am 20.11.1978 in Plauen

## Gutachter

1. Prof. Dr. Hans-Georg Schaible, Jena
2. Prof. Dr. Karl-Jürgen Bär, Jena
3. Prof. Dr. Karl Meßlinger, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.10.2013

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AMPA-Rezeptor	Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat-Rezeptor
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
AP	Aktionspotential
BMS-345541	4(2'-aminoethyl)amino-1,8-dimethylimidazol(1,2-a)quinoxaline
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
COX-1/2	Cyclooxygenase 1 und 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
IC <sub>50</sub>	Als mittlere inhibitorische Konzentration (IC <sub>50</sub> ) wird die Konzentration eines Inhibitors bezeichnet, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird. In der Pharmakologie wird der IC <sub>50</sub> verwendet, um die Wirkstärke eines Antagonisten anzugeben. Dieser ist vergleichbar mit der EC <sub>50</sub> eines Agonisten.
GABA	Gamma-Aminobutyric-Acid
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
IL	Interleukin
IκB	inhibitorische kappa-B-Proteine
IKK	IkappaB-Kinase
iNOS	inducible Nitric Oxidase Synthase
NEMO	NF-κB essential modulator
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	Nerve Growth Factor

NIK	NF-κB-induzierende Kinase
NK-Rezeptor	Neurokinin-Rezeptor
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NMDA-Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PGE/PGI	Prostaglandin E/I
RF	Rezeptives Feld
Ser-32/36	Serin 32/36
SP	Substanz P
TENS	Transkutane elektrische Nervenstimulation
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRPV1-Rezeptor	Transient Receptor Potential Vanilloid 1
WDR-Neurone	wide dynamic range Neurone

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
2.1. SCHMERZ	3
2.1.1. Definition	3
2.1.2. Allgemeines	4
2.1.3. Schmerzeinteilung	5
2.2. DAS NOZIZEPTIVE SYSTEM	8
2.2.1. Anatomie und Physiologie	8
2.2.2. Nozizeptoren	9
2.2.3. Weiterleitung nozizeptiver Impulse	12
2.2.4. Nozizeptive Neurone des Rückenmarks	16
2.3. ENTZÜNDUNGSSCHMERZ/NEUROGENE ENTZÜNDUNG	17
2.3.1. Entzündungszeichen	17
2.3.2. Periphere Sensibilisierung	19
2.3.3. Zentrale/spinale Sensibilisierung	20
2.3.4. Grundlagen des Gelenkschmerzes	23
2.3.5. Entzündungsmediatoren	23
2.3.6. Transmitter	24
2.4. IKAPPAB-KINASE VERMITTELTE ENTZÜNDUNGSKASKADE	29
2.4.1. Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B	29
2.4.2. I $\kappa$ B	30
2.4.3. IKK-Komplex	30
2.4.4. NF- $\kappa$ B-Signalweg	31
2.5. THERAPIEMÖGLICHKEITEN	33
2.5.1. Analgetika	35
2.5.1.1. NSAR	35
2.5.1.2. Opioide	37
2.5.1.3. NF- $\kappa$ B-Blockade	38
2.5.1.4. Blockade von Calciumkanälen	38
2.5.1.5. Medikamentöse Hemmung der nozizeptiven Transmission	38
2.5.2. Alternative schmerzreduzierende Medikamente	39
2.5.3. Nicht-medikamentöse Schmerztherapie	39
2.6. ZIELE DER ARBEIT	40
<b>3. METHODIK</b>	<b>41</b>
3.1. TESTSUBSTANZEN	41
3.2. VERSUCHSVORBEREITUNG	41
3.2.1. Herstellung der Carbonfaserelektroden	41
3.2.2. Versuchstiere	42
3.2.3. Narkose und Überwachung von Vitalfunktionen und Temperatur	42
3.2.4. Präparation	43
3.3. REGISTRIERUNG UND AUFARBEITUNG NEURONALER AKTIVITÄT	44
3.4. VERSUCHSABLAUF	46
3.4.1. Eingrenzung und Separierung des Ableitgebietes	46

3.4.2. Aufsuchen von Neuronen	46
3.4.3. Versuchsprotokoll	48
3.5. AUSWERTUNG	52
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
4.1. CHARAKTERISIERUNG DER SPINALEN NEURONE	54
4.1.1. Klassifikation	54
4.1.2. Lokalisation	54
4.1.3. Rezeptive Felder	54
4.2. EINFLUSS TRÄGERSUBSTANZEN UND TESTSUBSTANZEN AUF DIE NEURONALE AKTIVITÄT	55
4.3. EINFLUSS EINER GELENKENTZÜNDUNG AUF DIE NEURONALE AKTIVITÄT	57
4.3.1. Neuronale Aktivität bei im Verlauf induzierter Entzündung	57
4.3.1.1. Effekt eines Vehikels auf die Aktivität	58
4.3.1.2. Effekt des IKK-Inhibitors S1627 auf die Aktivität	59
4.3.2. Neuronale Aktivität bei bestehender Entzündung	60
4.3.2.1. Effekt eines Vehikels auf die Aktivität	61
4.3.2.2. Effekt des IKK-Inhibitors S1627 auf die Aktivität	61
4.4. ZUSAMMENFASSUNG DER VERSUCHSERGEBNISSE	63
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>64</b>
5.1. KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODIK	64
5.1.1 Tiermodell	64
5.1.2 Versuchsvorbereitung	64
5.1.3 Stimulation	65
5.1.4 Aufsuchen und Ableitung der Hinterhornneuronen	66
5.2. WIRKUNG DER TESTSUBSTANZ AUF DIE SPINALE ÜBEREREGBARKEIT	67
5.2.1 Effekt vor Generierung einer peripheren Entzündung	67
5.2.2 Effekt bei bestehender peripherer Entzündung	68
5.3. IKK-INHIBITOREN UND FUNKTIONEN	72
5.3.1 Rheumatoide Arthritis	72
5.3.2 Osteoporose	74
5.3.3 Neurodegenerative Erkrankungen	74
5.3.4 Tumorerkrankungen	75
5.3.5 Andere IKK-Inhibitoren und ihre Funktionen	76
5.4. PERSPEKTIVEN	77
5.5. KOMBINIERTES SCHMERZTHERAPIE	78
5.6. SCHLUSSFOLGERUNGEN	79
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>82</b>
<b>7. ANHANG</b>	<b>96</b>

## Zusammenfassung

Bei Entzündungsreaktionen ist die Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch die I $\kappa$ B-Kinase (IKK) der erste Schritt der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der Hochregulierung der NF- $\kappa$ B-abhängigen Gene. Dieser liegt als inaktiver Komplex, gebunden an ein I $\kappa$ B-Protein, im Zytoplasma. Bei entsprechendem Stimulus wird I $\kappa$ B-Protein phosphoryliert mit nachfolgender Ubiquitinierung und Proteolyse von I $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B wird so freigesetzt, es kommt zur Translokation in den Zellkern und zur anschließenden Gentranskription. Erste Hinweise zeigten, dass NF- $\kappa$ B auch direkt an der Sensibilisierung des nozizeptiven Systems beteiligt ist. Tegeder et al (2004) zeigten, dass der spezifische IKK-Inhibitor S1627 bei intraperitonealer Applikation bei generierter peripherer Entzündung einen antinozizeptiven Effekt hat. Dosisabhängig konnte eine vollständige Rückbildung der induzierten Hyperalgesie und der NF- $\kappa$ B-abhängigen Hochregulation von COX-2, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erzielt werden. Daraus entwickelten wir die Hypothese, dass auch die Hemmung der IKK zur Hemmung der entzündungsbedingten spinalen Übererregbarkeit von Hinterhornneuronen und damit zur Reduktion im neuronalen Antwortverhalten führt. Um diese Hypothese zu prüfen, führten wir Versuche mittels elektrophysiologischer Ableitungen von nozizeptiven Hinterhornneuronen von narkotisierten Ratten durch. Der spezifische IKK-Inhibitor S1627 wurde direkt spinal appliziert entweder vor oder nach Generierung einer akuten Arthritis im Kniegelenk. Wir konnten zeigen, dass die entzündungsbedingt auftretenden neuronalen Veränderungen im Rückenmark bei spinaler Applikation der Substanz S1627 vor Induktion einer peripheren Entzündung vollständig blockiert werden konnten und schlossen daraus, dass die spinale NF- $\kappa$ B-Aktivierung einen entscheidenden Schritt bei der Entwicklung neuronaler Übererregbarkeit darstellt. Die Hemmung des spinalen NF- $\kappa$ B nach Ausbildung einer peripheren Entzündung und spinalen Übererregbarkeit wiederum führte über einen Zeitraum von 2,5 Stunden nicht zur Abnahme im nozizeptiven Antwortverhalten bei peripherer mechanischer Stimulation. Dieses deutet darauf hin, dass antinozizeptive Effekte des Hemmers bei ausgebildeter peripherer Entzündung eher auf peripherer als auf spinaler Ebene zu erwarten sind und sie nicht abhängig von einer kontinuierlichen NF- $\kappa$ B-Aktivierung auf spinaler Ebene sind. Unsere Daten und die von Tegeder et al lassen den Schluss zu, dass sich die Hemmung der IKK als interessante neue Therapieoption gegen

Schmerzen bei entzündlichen Erkrankungen und pathologischem Schmerz erweisen könnte. Dies ist von besonderem Interesse, weil die IKK ohnehin eine Schlüsselrolle z.B. bei der rheumatoiden Arthritis spielt. Die rheumatoide Arthritis (RA) zeichnet sich durch eine Entzündung in den Gelenken aus mit Zerstörung von Knorpel und Knochen. Zytokine werden hierbei für den Pathomechanismus verantwortlich gemacht, induziert durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Ziel sollte also in Zukunft sein, in dieser Richtung weitere Forschungsarbeiten vorzunehmen, um spezifische entzündungshemmende Medikamente zu entwickeln mit möglichst wenigen Nebenwirkungen. Hierbei ist von Interesse, dass die bei der Phosphorylierung betroffenen Serine Ser-32 und Ser-36 sowohl bei I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  nachgewiesen wurden (Weil et al (1997)). Die Phosphorylierung erfolgt mittels I $\kappa$ B-Kinase (IKK) bestehend aus den zwei Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ . Es konnte nachgewiesen werden, dass sämtliche proinflammatorische Reize, einschließlich Viren, Zytokine und Lipopolysaccharide, IKK $\beta$  benötigen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Ghosh S et Karin M (2002)). Inzwischen konnte auch eine Beteiligung von IKK $\epsilon$  am NF- $\kappa$ B-Signalweg gezeigt werden. Neben anderen Funktionen wurde in vitro ihre Funktion bei entzündungsbedingter Hyperalgesie nachgewiesen.



## **2. Einleitung**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung des I $\kappa$ B-Kinase-Inhibitors S1627, entwickelt von der Firma Aventis, auf die Übererregbarkeit von Hinterhornneuronen während einer akuten Arthritis im Kniegelenk. Hintergrund hierbei ist die bereits nachgewiesene Beeinflussung von Entzündungsschmerz und neuropathischen Schmerz durch Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.

Es folgt ein Überblick zum Thema Schmerz im Allgemeinen und zum Thema Nozizeptives System mit Signalwegen.

### **2.1. Schmerz**

#### **2.1.1. Schmerzdefinition**

Schmerz wird nach der „International Association for the Study of Pain“ folgendermaßen definiert:

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verbunden ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“

Von dieser Definition ausgehend wird klar, dass Schmerz nicht nur ein Sinneseindruck wie Sehen und Hören ist, sondern eine komplexe Empfindung. Er benötigt die Sensitivität für chemische Veränderungen im Gewebe und dann die entsprechende Interpretation, dass diese schädlich sind. Die Empfindung Schmerz kann unabhängig davon sein, ob eine Schädigung vorliegt oder nicht. Für die Formulierung dieser Empfindung bedarf es der Kognition, zur Folge hat sie emotionale Konsequenzen und Konsequenzen im Verhalten.

### 2.1.2. Allgemeines

Die Fragen nach Entstehung von Schmerzen, die Kodierung und Leitung von nozizeptiver Information bis zur zentralen Verarbeitung umfassen ein großes Wissenschaftsgebiet, mit dem sich unter anderem der englische Neurologe Head (Head H (1920)) auseinandersetzte. Er forschte vor ca. 90 Jahren bereits zu dem Phänomen des übertragenen Schmerzes von erkrankten inneren Organen in bestimmte Hautregionen, die heute noch als Headsche Zonen bekannt sind.

Die weitere Forschung führte in den folgenden Jahren zu einem besseren Verständnis und detaillierteren Vorstellungen der komplexen beteiligten Strukturen und Substanzen. Doch noch heute bleiben viele Fakten ungeklärt.

Schmerz ist kein einfaches physiologisches Signal, das nur dazu dient, vor tatsächlichen oder potentiellen körperlichen Gefahren zu warnen. Es ist als eine komplexe, multidimensionale und von vielen Einflussfaktoren abhängige Erfahrung zu beurteilen. Der Schmerz beinhaltet sowohl psychophysische Komponenten wie Intensität, Dauer, Charakter und Ort, als auch emotionale wie Unwohlsein, Ablehnung und bei chronischen Schmerzen auch Depression. Jene Warnfunktion besteht und ist sinnvoll, sogar überlebenswichtig, weil sie über innere oder äußere Bedrohungen informiert. Aber die als Nozizeption bezeichneten neurophysiologischen Prozesse führen nicht zwangsläufig zur Schmerzwahrnehmung, da sie durch Kontextfaktoren beeinflusst werden. Als Beispiele dafür dienen schwere Verletzungen bei Verkehrsunfällen oder im Krieg, bei denen Schmerzen zunächst nicht wahrgenommen werden. Die Wahrnehmung und Verarbeitung von Körpersignalen ist das Resultat aus einer komplexen Wechselwirkung von bio-psycho-sozialen Faktoren. Deshalb sollte das Symptom Schmerz immer genau analysiert werden. Besonders bei chronischen Schmerzen, bei denen manchmal kein nachweisbarer nozizeptiver Reiz mehr vorliegt, sondern psychologische und soziale Faktoren eine große Rolle spielen, ist dies wichtig. Schmerzpatienten machen einen Großteil des gesamten Patientengutes aus, wovon der Großteil wiederum chronische Schmerzpatienten sind, die ca. ein Drittel der ambulanten Arztbesuche ausmachen (Willweber-Strumpf et al. (2000)). Die Ursachen dafür sind in verschiedenen Bereichen zu suchen. Entzündungen machen einen nicht unwesentlichen Teil aus, so z.B. chronische Gelenkentzündungen des

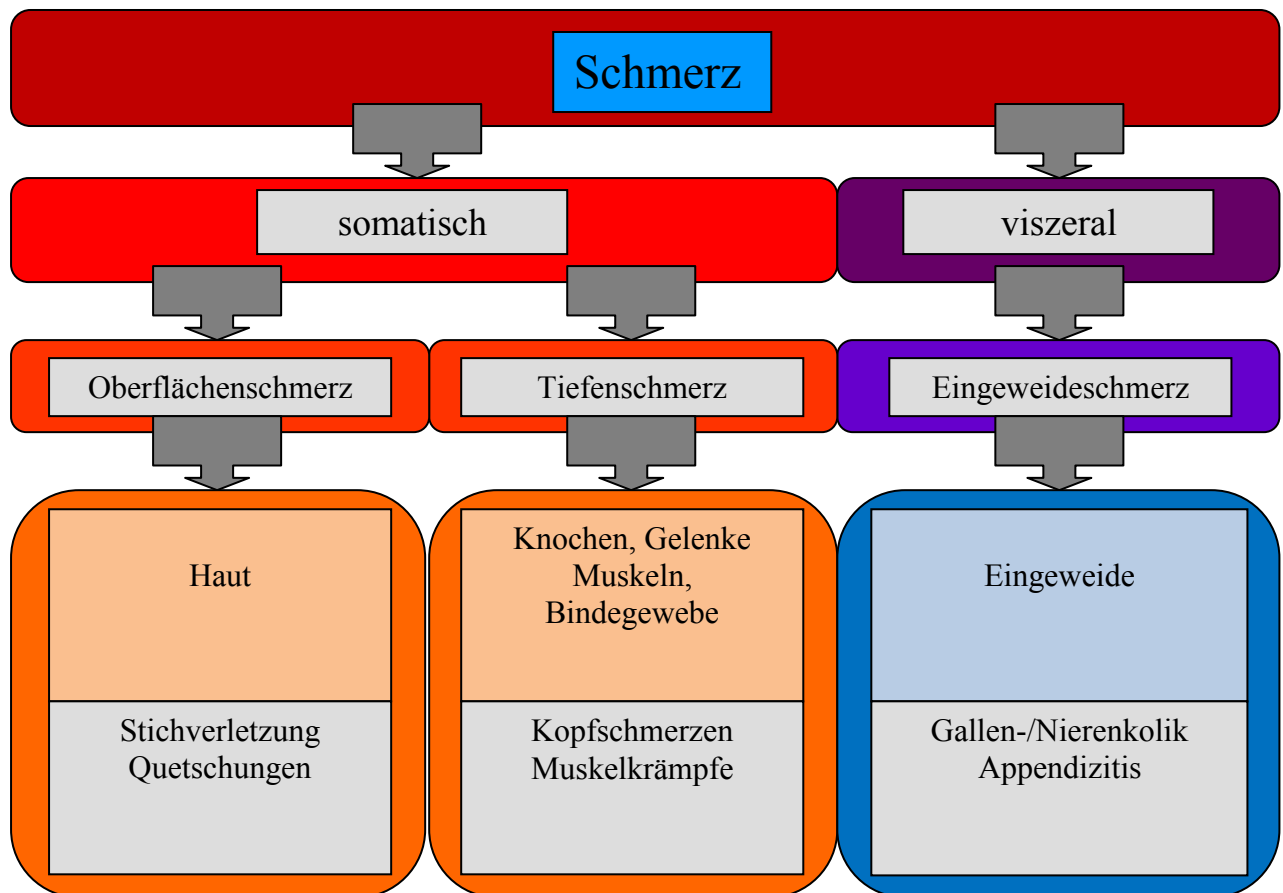
rheumatischen Formenkreises wie die rheumatoide Arthritis, an der ca. 0,3-1,5% der Weltbevölkerung leiden. Andere Ursachen können in neoplastischen Geschehen oder bedingt durch Traumata, iatrogen oder durch operative Interventionen gefunden werden.

Verschiedene Pharmaka, die an unterschiedlichen Stellen der Entzündungs- bzw. Schmerzkaskade ansetzen, sind bereits im Einsatz. Oft sind diese mit vielen Nebenwirkungen verbunden durch mehrere Angriffspunkte, oder sie führen nach längerem Gebrauch zur Gewöhnung. Eine bis heute bestehende Herausforderung ist also die Entwicklung von Analgetika bzw. Antiphlogistika, die mit möglichst geringen Nebenwirkungen zur Schmerzarmut oder sogar Schmerzfreiheit führen.

### **2.1.3. Schmerzeinteilung**

Der Schmerz umfasst im Hinblick auf den Ort der Entstehung verschiedene Qualitäten, den somatischen Schmerz, der wiederum in Oberflächenschmerz und Tiefenschmerz unterteilt werden kann, und den viszeralen Schmerz. Der Oberflächenschmerz wird als von der Haut ausgehender Schmerz bezeichnet. Er weist einen hellen Charakter auf, ist gut lokalisierbar und klingt nach Reizende rasch ab.

Der Tiefenschmerz, von Muskeln, Knochen, Gelenken und Bindegewebe ausgehend, ist von eher dumpfem Charakter, ist schlecht lokalisierbar und strahlt in die Umgebung aus, z.B. Gelenkschmerz. Siehe hierzu Abbildung 2.1.



**Abbildung 2.1** Schmerzeinteilung (modifiziert nach Schmidt/Thews: Physiologie des Menschen, 1997, Springer-Verlag)

Ferner lässt sich der Schmerz nach der Dauer einteilen in akuten und chronischen Schmerz.

Der akute Schmerz wird regelhaft ausgelöst durch Gewebeläsionen als Folge von Traumen, Entzündungen, starken thermischen oder chemischen Reizen. Er wird vom Körper als Bedrohung bewertet, was mit Angst und Erregung und den damit verbundenen vegetativen Begleitsymptomen, wie Blutdruck- und Herzfrequenzanstieg und Schweißausbrüchen einhergeht. Der akute Schmerz ist meistens auf den Ort der Verletzung begrenzt, gut lokalisierbar und klingt nach Wegfall des Reizes ab. Das Ausmaß des Schmerzes steht in Korrelation zur Reizintensität.

Chronischer Schmerz bzw. ein chronisches Schmerzsyndrom besteht, wenn der Schmerz selbständigen Krankheitswert erhält und länger als sechs Monate besteht bzw., wenn der Schmerz über die für die Heilung angemessene Zeit hinaus verbleibt (Turk DC und Okifuji A (2001)). Im Hinblick auf den Pathomechanismus können drei Schmerzformen definiert werden.

Der **physiologische Nozizeptive Schmerz**, der durch die Einwirkung einer Noxe auf normales Gewebe hervorgerufen wird. Dies entspricht dem Warnsystem des Körpers, welches auf intensive Noxen mit Schmerz reagiert, um den Körper vor Schäden zu schützen, z.B. bei Verbrennungen der Haut.

Der **pathophysiologische Nozizeptive Schmerz**, der durch Gewebepathologien hervorgerufen wird, z.B. bei Weichteilinfekten, bei denen intensive Noxen zur Schmerzauslösung nicht mehr notwendig sind und Schmerzmediatoren die vordergründige Ursache bilden, die lokal die Erregungsschwelle der peripheren Nozizeptoren herabsetzen. Zum Teil sind diese vergesellschaftet mit Hyperalgesie, der verstärkten Wahrnehmung noxischer Reize, und Allodynie, der schmerzhaften Wahrnehmung nicht noxischer Reize. Das nozizeptive System, bzw. die synaptische Übertragung im Rückenmark und in höheren Gehirnregionen ist insgesamt sensibler, der Schmerz kann chronifizieren.

Der **Neuropathische Schmerz**, der durch eine Neuronen- oder Nervenschädigung des peripheren oder zentralen Nervensystems hervorgerufen wird. Dieser geht oft mit brennendem Schmerz und Spontanschmerz einher. Es liegt kein geschädigtes Korrelat im innervierten Gewebe vor, z.B. können längere Zeit Druck ausgesetzte Nozizeptoren spontan Aktionspotentiale bilden. Oder Neurome, Neuritenauswüchse der durchtrennten Stümpfe, bilden sich nach kompletter Nervendurchtrennung, die elektrische Verknüpfungen zu anderen afferenten Nervenfasern bilden können. So können C-Fasern, die im Rückenmark nozizeptive Neurone aktivieren, plötzlich zusätzlich von leichten mechanischen oder sympathischen Reizen innerviert werden. Der neuropathische Schmerz ist oft chronisch und nur schwer zu therapieren. Ursache sind neben Traumen auch stoffwechselbedingte Krankheiten wie Diabetes mellitus (Schaible H.-G. (2000)// Woolf, C.J. (2004)).

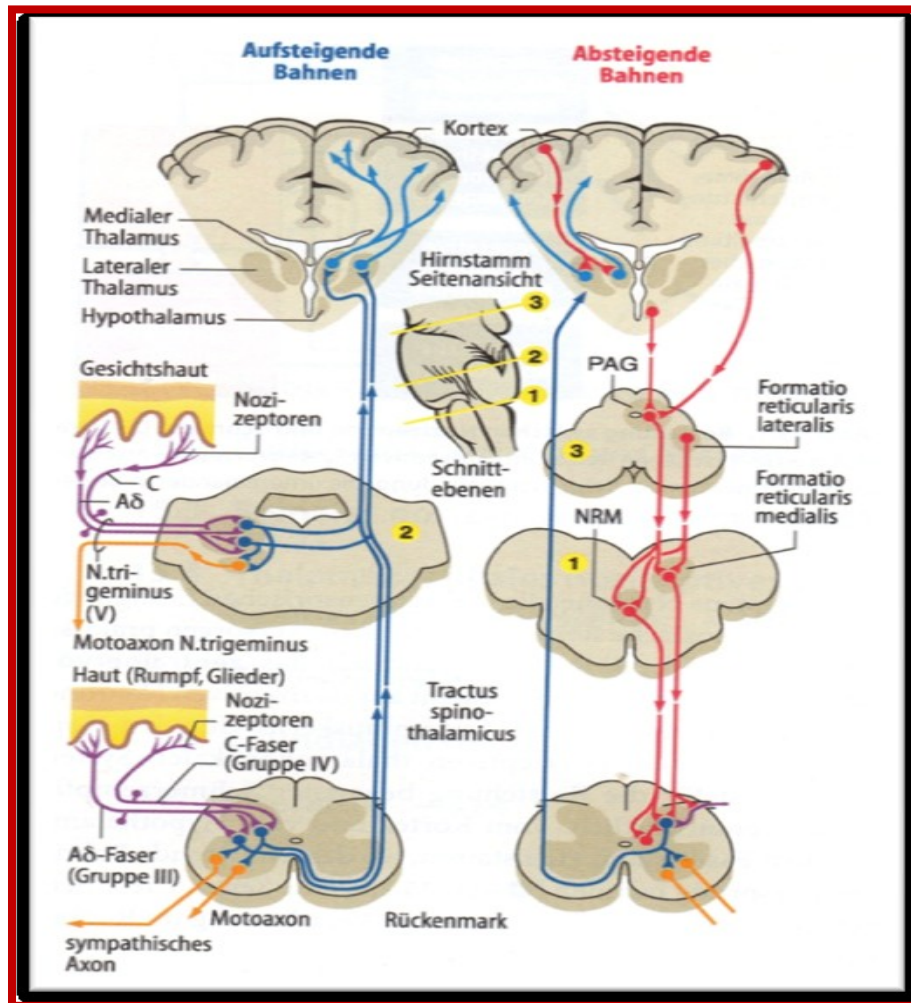
## **2.2. Das nozizeptive System**

Nozizeption (lat. *noxa* = Schaden) beschreibt Prozesse der Rezeption, Weiterleitung und zentralen Verarbeitung eines gewebeschädigenden oder potentiell gewebeschädigenden Reizes im Nervensystem durch das **nozizeptive System** (Schaible, Schmidt (1995)). Hierbei wird das periphere vom zentralen bzw. spinalen nozizeptiven System unterschieden. Hierauf wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

Man unterscheidet **Schmerz** als unangenehme Sinnesempfindung, die durch die Einwirkung schädigender Noxen ausgelöst wird, von **Nozizeption**, welches die Aufnahme und Verarbeitung noxischer Reize durch das Nervensystem ist (Schaible, H.-G. (2010)). Gemessen werden kann die Nozizeption u.a. durch die Ableitung einzelner nozizeptiver Nervenzellen, was in den folgenden Abschnitten noch dargestellt werden wird.

### **2.2.1. Anatomie und Physiologie**

Schmerz ist eine autonome Sinnesmodalität, deren neuronaler Apparat nozizeptives System genannt wird. Unter Nozizeption versteht man die Aktivität von noxischen Reizen verarbeitenden peripheren und zentralnervösen Neuronengruppen. Dies beinhaltet die Aktivierung der für den Schmerz spezifischen Sinnesrezeptoren, Nozizeptoren, durch gewebeschädigende oder potentiell schädliche Reize, Noxen, mit nachfolgender Generierung eines Aktionspotentials in den primär afferenten Nervenfasern. Es beinhaltet die anschließende Weiterleitung des Aktionspotentials in den äußeren dorsalen Schichten des Rückenmarks (Laminae I und II) oder im Trigeminskern und weiter in den Hirnstammneuronen und über aufsteigende Bahnen schließlich die Verarbeitung der Signale in höheren Gehirnregionen. Wichtige Stationen der zentralen nozizeptiven Verarbeitung sind der Thalamus, der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex, verantwortlich für die sensorisch-diskriminative Komponente des Schmerzes (Siehe hierzu Abb. 2.2.)



**Abb. 2.2** Das nozizeptive System;

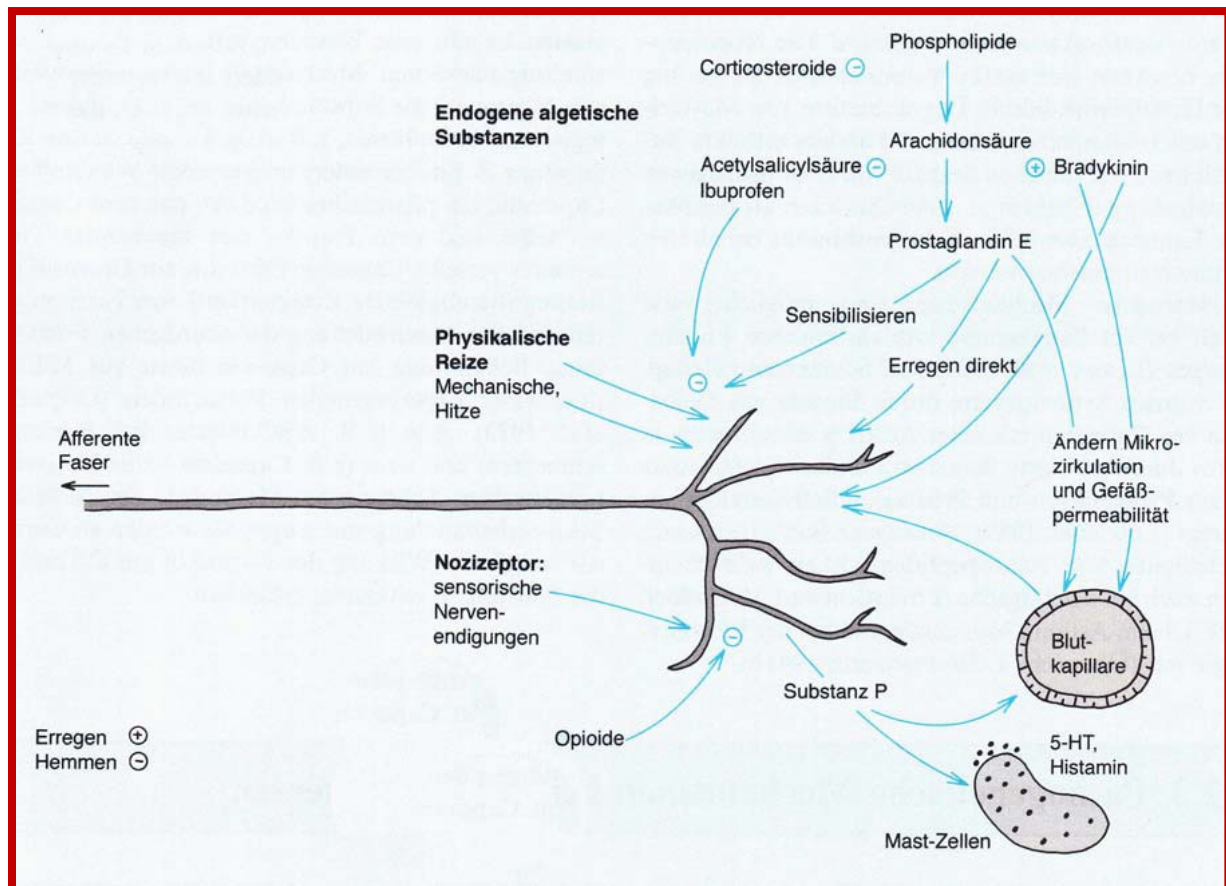
*Linker Bildteil:* Noxische Reize aufnehmende und verarbeitende Neurone und Nervenbahnen des peripheren und zentralen Nervensystems; *Rechter Bildteil:* Absteigende Bahnen, die die nozizeptive Verarbeitung im Rückenmark hemmen oder bahnen; *Mittiges Bild:* Seitenansicht des Hirnstamms mit Lage der Hirnstammschnitte, (PAG: periaquäduktale Grau, NRM: Nucleus raphe magnus) (Schaible H.-G. (2010))

### 2.2.2. Nozizeptoren

Nozizeptoren sind freie Nervenendigungen mit wegführenden Axonen, afferente marklose C-(bzw. Gruppe IV-) Fasern mit geringer Leitgeschwindigkeit oder dünn myelinisierte Aδ-(bzw. Gruppe III-) Fasern mit hoher Leitgeschwindigkeit, die nozizeptive Botschaften vom Gewebe ins ZNS leiten (Siehe Abbildung 2.3).

In den nozizeptiven Endigungen selbst findet die Umwandlung von noxischen Reizen in elektrische Potentiale, Generatorpotentiale, statt, was als **Transduktion** bezeichnet wird. In den dazugehörigen Axonen findet die Umwandlung der

Generatorpotentiale in Aktionspotentiale statt, bezeichnet als **Transformation** (Schaible, H.-G. (2010)).



**Abb. 2.3** Nozizeptor mit Aktivatoren und Inhibitoren (aus Zenz & Juma, 1993, S. 5)

Man unterscheidet drei Haupttypen von Nozizeptoren.

- Es kommen *hitzeempfindliche Nozizeptoren* vor, die nur auf Überwärmung der Haut über 45°C reagieren.
- Es gibt *mechanosensible Nozizeptoren*, die nur auf ausgeprägte mechanische Reize reagieren, z.B. Nadelstichverletzungen.
- Der dritte Typ sind die *polymodalen Nozizeptoren*, die auf mehrere Reize, thermische, chemische und mechanische, ansprechen, sobald diese eine gewebeschädigende Wirkung haben.

Sowohl bei den monomodalen als auch bei den polymodalen Nozizeptoren gibt es solche, die bereits bei nicht noxischen Reizen eine schwache Antwort zeigen und hochschwellige, die nur auf noxische Reize antworten. Nozizeptoren, die nur im



geschädigten Gewebe aktiviert werden, nennt man auch „schlafende Rezeptoren“ (Mc Mahon S (1990)).

Nozizeptoren sind nahezu im gesamten Körper mit Ausnahme des Gehirns verteilt. Sie kommen sowohl in der Haut, als auch in fast allen anderen Geweben des Körpers vor, so auch im Bewegungsapparat und im Viszerum. In einem Hautnerv sind z.B. etwa 50% der sensorischen Fasern nozizeptiv. Sie scheinen vorzugsweise in der Adventitia der kleinen Blut- und Lymphgefäße in unmittelbarer Nachbarschaft zum Gefäßlumen zu enden, aber auch in den Bindegewebsräumen und im Endoneurium selbst (H.-G. Schaible, Schmidt (2000) // Andres K.H. (1985)).

Schmerzen, die von der Körperoberfläche ausgehen, werden durch Nozizeptoren der Haut initiiert, die vor allem durch mechanische und Hitzereize aktiviert werden. Viszerale Nozizeptoren werden u.a. durch Kontraktion von Hohlorganen erregt. Schmerzen im Bewegungssystem werden durch Nozizeptoren in Muskeln, Sehnen, Knochen, Periost und Gelenken initiiert. Die rezeptiven Endigungen sind auf bestimmte adäquate Reize spezialisiert, die sie kodieren. In der Haut, der Skelettmuskulatur, in Sehnen und Gelenkgewebe existieren Nozizeptoren, die sowohl auf mechanische Reize wie Stiche und Prellungen, chemische Reize wie Bradykinine und Prostaglandine, als auch auf thermische Reize wie Hitze und Kälte antworten und damit polymodalen Charakter besitzen (Mense S (1986)).

Hiervon abzugrenzen sind die nicht korpuskulären Nervenendigungen in Haut, Skelett- und Herzmuskeln, Sehnen, Gelenken und Eingeweiden, die nicht als Nozizeptoren dienen. Sie sind spezifisch für mechanische und thermische Reize geringer Intensität oder nicht noxische chemische Reize. Sie lösen keine Schmerzen aus.

### **2.2.3. Weiterleitung nozizeptiver Impulse**

#### **Periphere Weiterleitung nozizeptiver Impulse im Axon der Nozizeptoren**

Zunächst werden Generatorpotentiale in der peripheren sensorischen Nervenendigung generiert durch Aktivierung von Ionenkanälen und Rezeptoren. Vermutet wird, dass durch noxische mechanische Reize eine Öffnung von

Kationenkanälen resultiert und damit eine Depolarisation bewirkt wird. Durch Hitzereize wird der Vanilloidrezeptor 1, TRPV1-Rezeptor, ebenfalls ein Kationenkanal geöffnet, was eine Depolarisation bewirkt. Gewebsmediatoren, wie Entzündungsmediatoren, binden an Rezeptoren, veranlassen so die Bildung von Second Messenger und modulieren damit die Öffnung der Ionenkanäle bewirken (H.-G. Schaible (2010)).

Die so entstandenen Generatorpotentiale werden in markhaltigen oder marklosen Axonen in Aktionspotentiale umgewandelt und über Hinterwurzelganglien (Dorsal Root Ganglia, DRGs) ins zentrale Nervensystem, zum Hinterhorn des Rückenmarkes, weitergeleitet. Hierbei leiten die A $\delta$ -Fasern, Einteilung nach Erlanger/Gasser, siehe Tabelle 2.2, mit einer Übertragungsgeschwindigkeit von durchschnittlich 2,5-20 m/s Impulse von Schmerzrezeptoren weiter, weshalb sie als schnell leitende Schmerzfasern gelten. Wohingegen die marklosen Gruppe C-Fasern, die den Gruppe IV-Fasern entsprechen, den dumpfen, schlecht lokalisierbaren sekundären Schmerz übertragen und die Impulse mit einer Geschwindigkeit von durchschnittlich 1 m/s weiterleiten.

Die dicken markhaltigen Gruppe-II-Fasern führen nicht zu Schmerzempfindungen, sie leiten Berührungsimpulse der Haut weiter. Die niederschwelligen Gruppe III-Fasern, Einteilung nach Lloyd und Hunt, siehe Tabelle 2.1, führen ebenfalls zu keiner Schmerzempfindung, sondern leiten mit einer Übertragungsgeschwindigkeit von durchschnittlich 15 m/s afferente Impulse von tiefen Mechanorezeptoren des Muskels weiter (Schmidt R.F. (1990) // Strichartz G. (1993)).

Fasertyp	NLG	Beispiele	$\varnothing$ in $\mu$ m
I	75	primäre Muskelspindelafferenzen (myelinisiert)	13
II	55	Fasern für die Mechanorezeptoren der Haut	9
III	11	Fasern für tiefe Drucksensibilität (Muskel)	3
IV	1	marklose noziceptive Fasern (myelinfrei)	1

**Tabelle 2.1** Klassifikation der Nervenfasern nach Lloyd/Hunt (1948), angegeben sind die durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG) und die Durchmesser der Fasern ( $\varnothing$  in  $\mu$ m)

Fasertyp	NLG m/s	Beispiele	ø in µm
Aα	100	primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch zu Skelettmuskeln	15
Aβ	50	Hautafferenzen für Druck und Berührung	8
Aγ	20	Motorisch zu Muskelspindeln	5
Aδ	15	Hautafferenzen für Temperatur und Nozizeption	<3
B	7	Sympathisch präganglionär	3
C(marklos)	1	Hautafferenzen für Nozizeption, sympathische postganglionäre Efferenzen	1

**Tabelle 2.2** Klassifikation der Nervenfasern nach Erlanger/Gasser, angegeben sind die durchschnittlichen Nervenleitgeschwindigkeiten (NLG) und die Durchmesser der Fasern ( ø in µm) (Schmidt & Thews, 1995, S. 37)

Neben diesen aufgeführten afferenten Fähigkeiten können peptiderge Nozizeptoren verschiedene Neuropeptide synthetisieren und freisetzen und haben damit auch efferente Eigenschaften. Dieses führt zur neurogenen Entzündung mit entsprechender Begleitsymptomatik wie Rötung, Schwellung und Überwärmung (Schaible, H. G. und Richter, F. (2004)).

### Zentrale Weiterleitung nozizeptiver Impulse

Die zentrale Weiterleitung erfolgt von den nozizeptiven Endigungen zum Spinalganglion, wo der Zellkörper der Nozizeptoren liegt, und weiter zum Hinterhorn des Rückenmarks. Dieses beinhaltet zehn Laminae, von denen die Laminae I, II und V relevant sind für die Nozizeption. Die oberflächliche Schicht Lamina I empfängt Afferenzen aus dem Viszerum und mit Lamina V zum Großteil nozizeptive Afferenzen aus Haut und darunter liegendem Weichteilgewebe wie Muskeln. In Lamina I finden sich vor allem Neurone, die synaptischen Kontakt mit den

nozizeptiven A $\delta$ - und C-Fasern haben. In Lamina II endet ein Großteil der marklosen Afferenzen aus der Haut (Zenker, W. (1994)).

Im Hinterhorn erfolgt die synaptische Erregungsübertragung der Rückenmarkszellen zumeist lokal auf andere Neurone. Oder Rückenmarkszellen projizieren mittels Glutamat als Haupttransmitter auf Projektionsneurone, deren aufsteigende Axone nach Kreuzung nach kontralateral noch auf spinaler Ebene in der wichtigsten zentralen Schmerzbahn, im Tractus spinothalamicus des Vorderseitenstrangs, in den Thalamus ziehen und nach erneuter Umschaltung im Thalamus zum somatosensorischen Kortex aufsteigen. Somit werden Schmerzempfindungen aus der rechten Körperhälfte auf der linken Seite des Rückenmarks zum Gehirn geleitet und entsprechend umgekehrt.

Thalamus und Großhirnrinde bewirken die bewusste Schmerzempfindung und Lokalisation. Parallel findet die emotionale Schmerzverarbeitung im limbischen System und Frontalhirn statt, die eine Bewertung des Schmerzes als negativ empfundenes Erlebnis ermöglichen (Illes P., Allgaier C. (2005)// Schmidt, R.F., Schaible, HG. (2001)). Siehe hierzu Abbildung 2.4.

Man spricht hierbei von den drei Komponenten der Schmerzwahrnehmung nach Handwerker, H.O. (2001).

- *Sensorisch-diskriminative Komponente:*

Über den ventrobasalen Thalamuskern werden die Reizintensität, die Reizdauer und die Lokalisierung des Reizes wahrgenommen durch Projektion in somatosensorische Projektionsfelder des Kortex.

- *Affektive Komponente:*

Durch Projektion in Hirnstamm und Hirnrinde wird ein Aktivierungseffekt ausgelöst. Durch Projektion ins limbische System lösen Schmerzreize emotionale Reaktionen aus wie Angst oder Unlust.

- *Kognitiv-bewertende Komponente:*

Der frontale Kortex dient verschiedenen Lernprozessen, um Schmerz als harmlos oder bedrohlich einzuordnen und ihn anhand des Erlernten zu bewerten. Spezifische Verhaltensmuster werden ausgelöst wie Jammern und entsprechende Bewältigungsmaßnahmen werden ergriffen.

Einige Neurone sind in motorische und vegetative Reflexbögen eingebunden und ziehen nicht im Tractus spinothalamicus zum Gehirn. Diese Reflexe werden in spinale und supraspinale Reflexe unterteilt.

Ein bekannter **spinaler Reflex**, auch beschrieben als *motorische Komponente*, ist der Wegziehreflex, der Extremitäten schnell noxischen Reizen entzieht. Vermittelt wird dieser Flexionsreflex durch Interneurone, die im Rückenmark zwischengeschaltet sind zwischen den nozizeptiven Afferenzen und den Motoneuronen. Dies führt zur Hemmung der antagonistischen ipsilateralen Extensormotoneurone. Zur Körperstabilisierung wird zeitgleich ein Streckreflex der Gegenseite ausgelöst.

Unter Stress beispielsweise können **supraspinale Reflexe** ausgelöst werden, was auch als *vegetative Komponente* beschrieben wird, die der Kontrolle des Hirnstammes unterliegen. Hierbei kommt es zur reflektorischen Erregung des vegetativen Nervensystems mit Verstärkung des Sympathikus, woraus eine komplexe Abwehrreaktion resultiert mit Hemmung des Magen-Darm-Traktes, Aktivierung des Nebennierenmarkes, besserer Durchblutung der Muskulatur, Erhöhung der Schweißsekretion und Steigerung der Atemfrequenz und des Herzzeitvolumens durch Steigerung von Blutdruck und Herzfrequenz (H.-G. Schaible, Schmidt (2000)).

Bei sehr starker Schmerzsymptomatik wiederum kann es auch zur Verstärkung des Parasympathikus mit Blutdruckabfall, Schweißausbruch und Übelkeit kommen.

#### **2.2.4. Nozizeptive Neurone des Rückenmarks**

Die Klassifikation nozizeptiver Neurone ergibt sich aus dem Antwortverhalten auf periphere und mechanische Reize. Man unterscheidet niederschwellige, hochschwellige und WDR-Neurone.

**Niederschwellige Neurone (low-threshold-/LT-Neurone)** reagieren auf leichte Berührungsreize z.B. der Haut und werden durch taktile A $\beta$ -Fasern erregt. Bei der Nozizeption spielen sie wahrscheinlich keine Rolle.

**Hochschwellige Neurone (high-treshold-/HT-Neurone)** reagieren unter physiologischen Bedingungen nur auf solche Reize, die auch nozizeptive Afferenzen erregen. Sie dienen der Ortsdiskrimination aufgrund ihres kleinen rezeptiven Feldes.

**WDR-(wide-dynamic-range-)Neurone** werden von taktilen A $\beta$ -Fasern und von Nozizeptoren erregt, so dass im Rückenmark die Verschaltung vieler aus der Peripherie kommender Neurone auf ein einziges erfolgt, weshalb sie auch konvergente Neurone genannt werden. Sie weisen ein großes Rezeptives Feld auf und zeichnen sich durch eine niedrige Erregungsschwelle aus. Sie kodieren die Reizintensität von nicht noxischen Reizen bis hin zu stark noxischen Reizen.

An allen sensorischen Neuronen dient Glutamat als erregender Haupttransmitter (Klein, Th. et al (2007)).

Durch folgend aufgeführte Möglichkeiten lässt sich die Verschaltungsstelle im Rückenmark modulieren:

- Deszendierende Bahnen aus der Formatio reticularis hemmen über den Transmitter Serotonin die Verschaltung auf das WDR-Neuron.
- Deszendierende Bahnen innervieren ein hemmendes Interneuron im Rückenmark, welches daraufhin endogene Opiode wie Endorphine, Enkephaline ausschüttet und so zur Blockade der Signalweiterleitung über  $\mu$ -Rezeptoren führt.
- Schnelle A $\beta$ -Fasern sensorischer Afferenzen blockieren die Weiterleitung durch Modulation von Glutamat und Glutamat-Rezeptoren.

Durch zentrale Hemmsysteme wird das nozizeptive System kontinuierlich inhibitorisch kontrolliert. Eine verminderte Funktion der Hemmsysteme kann nachweislich zur erhöhten Schmerzempfindlichkeit führen, was wiederum die Chronifizierung der Schmerzen begünstigen kann. In der Schmerztherapie macht man sich diese Hemmsysteme zu Nutze (Zimmermann, M. (1993)).

## **2.3. Entzündungsschmerz/ Neurogene Entzündung**

### **2.3.1. Entzündungszeichen**

Die 4 Kardinalsymptome einer Entzündung wurden bereits von Celsius (30 v.-38 n.Chr.) und Galen (130-200 n.Chr.) beschrieben, das fünfte wurde durch Virchow (1821-1902) ergänzt, (siehe Abbildung 2.4):

- Rubor: Rötung durch Vasodilatation
- Calor: Überwärmung durch vermehrte Durchblutung
- Tumor: Schwellung durch Austritt von Plasmaeipweißen
- Dolor: Schmerz durch Nozizeption durch vermehrten Gewebedruck und schmerzauslösende Entzündungsprodukte
- Functio laesa: gestörte Funktion

Die diese Symptome verursachenden Mechanismen werden durch zelluläre und vaskuläre Reaktionen hervorgerufen. Als zelluläre Reaktion zeigt sich die Extravasation von Plasmaeipweißen in das geschädigte Gewebe. Vaskuläre Reaktionen sind neben Vasodilatation die Erhöhung der Gefäßpermeabilität und damit eine Exsudationssteigerung von Plasmamediatoren, die das Gerinnungssystem, das Kininsystem und das Komplementsystem beeinflussen. Sowohl Entzündungsmediatoren als auch das Kininsystem (Bradykinin) erregen afferente Nervenfasern und sensibilisieren die polymodalen und „schlafenden“ Rezeptoren, wodurch der typische Entzündungsschmerz ausgelöst wird.

Zusammen führen die vaskulären und zellulären Mechanismen zu den typischen Entzündungszeichen wie Schwellung, Überwärmung und Rötung (Jänig W (1993)// Böcker W et al (1997)). Hierbei steigt die Konzentration von Entzündungsmediatoren im Gewebe, die im Rahmen von Immunreaktionen bei Gewebeschädigungen durch Verbrennungen, bakterielle Infektionen oder chemische Noxen entweder freigesetzt werden wie Bradykinine aus dem Blutplasma, Serotonin aus zirkulierenden Leukozyten und Thrombozyten, Histamin aus Mastzellen oder von Leukozyten synthetisiert werden wie Prostaglandine und Leukotriene (Buddecke und Fischer (1992)/ Jelkmann (2010)).

Ein wichtiger Wirkstoff für das Verständnis der neurogenen Entzündung ist das Capsaicin, eine Homovanillinsäure, welches als aktiver Inhaltsstoff im Cayennepfeffer und in Peperoni vorkommt. Das Aufbringen auf die Haut führt zu einer deutlichen Hautrötung, einem Erythem, und zu einer Überwärmung, welche mit einer brennenden Hautsensation einhergehen. Die Interaktionen des Capsaicins mit den peripheren Prozessen der primär sensorischen Neurone werden seit über 40 Jahren durch den ungarischen Wissenschaftler Jancsó und viele weitere Wissenschaftler untersucht. Er beobachtete nach Hautapplikation von Capsaicin eine Vasodilatation und Plasmaextravasation, die auch durch Nervenstimulation in diesem Bereich ausgelöst werden konnten (Jancsó N et al (1967)). Nach sensibler Denervation blieb eine entsprechende entzündliche Reaktion aus, weshalb man auf die Beteiligung eines Transmitters schloss, der nach Reizung der peripheren sensiblen Nervenendigungen synthetisiert bzw. freigesetzt wird und zu den Effekten der neurogenen Entzündung führt. Als möglicher Transmitter an den Primärafferenzen wurde bereits 1979 von Lembeck und Holzer (Lembeck F, Holzer P (1979)) das Neuropeptid Substanz P vorgestellt. Sie zeigten, dass die Interaktion des Capsaicin-Moleküls mit einem speziellen, polymodalen Nozizeptor zu einer Freisetzung von Substanz P führt. Wiederholte Anwendungen mit Capsaicin hingegen führten zu einer Abnahme der Freisetzung und temporären Erschöpfung des Speichers von Substanz P aus den polymodalen Nozizeptoren. Konsekutiv zeigte sich eine Desensibilisierung und Abschwächung der neurogenen Entzündung.

### **2.3.2. Periphere Sensibilisierung**

Im Rahmen von Entzündungen kommt es zur Sensibilisierung von polymodalen und stummen Nozizeptoren.

Die Nozizeptorschwelle für noxische Reize ist weder für einen Schmerzrezeptor konstant noch für alle einheitlich. Im gesunden Gewebe liegen Nozizeptoren mit unterschiedlichen Schwellen vor, die zum Teil sehr hoch liegen. Bei Vorliegen einer pathophysiologischen Veränderung im Gewebe, z.B. Entzündung mit Ödembildung, Senkung des pH-Wertes durch chemische Substanzen, wie Säuren und Basen, und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren durch Mikroorganismen wie Bakterien



und Viren, und zuletzt bei allergischen Reaktionen, werden viele Nozizeptoren sensibilisiert, ihre Erregungsschwelle herabgesetzt. Das führt dazu, dass normalerweise nicht schmerzhaft Reize, wie leichte Berührungen, zu einer Erregung der Nozizeptoren führen und die Antworten auf noxische Reize zunehmen. Die erhöhte Erregbarkeit nozizeptiver Nervenendigungen bei Entzündungen und Traumata bezeichnet man als Periphere Sensibilisierung. Sie führt zur Allodynie, dem Auftreten von Schmerzen durch normalerweise nicht schmerzhaft Reize, und zur **primären Hyperalgesie** (siehe Abb. 2.4 A) im Gewebe, der erhöhten Schmerzempfindlichkeit bei noxischer Reizung. Spontanaktivität tritt bei vielen Nozizeptoren im entzündeten Gebiet auf, was zu den typischen Ruheschmerzen führt. Außerdem werden sogenannte „stumme“ Nozizeptoren sensibilisiert. Sie zeichnen sich durch eine extrem hohe Erregungsschwelle aus und stehen unter entzündungsfreien Bedingungen dem nozizeptiven System deshalb eher nicht zur Verfügung. Durch deren Sensibilisierung werden sie durch ihre sinkende Erregungsschwelle zu zusätzlichen Nozizeptoren und verstärken die Weiterleitung ins Rückenmark. Ein Beispiel für die periphere Sensibilisierung ist der Sonnenbrand, eine durch UV-Strahlung hervorgerufene Gewebeschädigung, die zur Hyperalgesie im betroffenen Bereich führt. Zu den oben genannten Mediatoren zählen Zytokine, Serotonin, Neurotrophine, Bradykinin, Histamin, ATP, Prostaglandine und andere (H.-G. Schaible et al (2002)/ H.-G. Schaible (2010)). Diese Mediatoren können die Nozizeptoren entweder direkt erregen, wie Bradykinine, oder für andere Stimuli sensibilisieren, wie Prostaglandine.

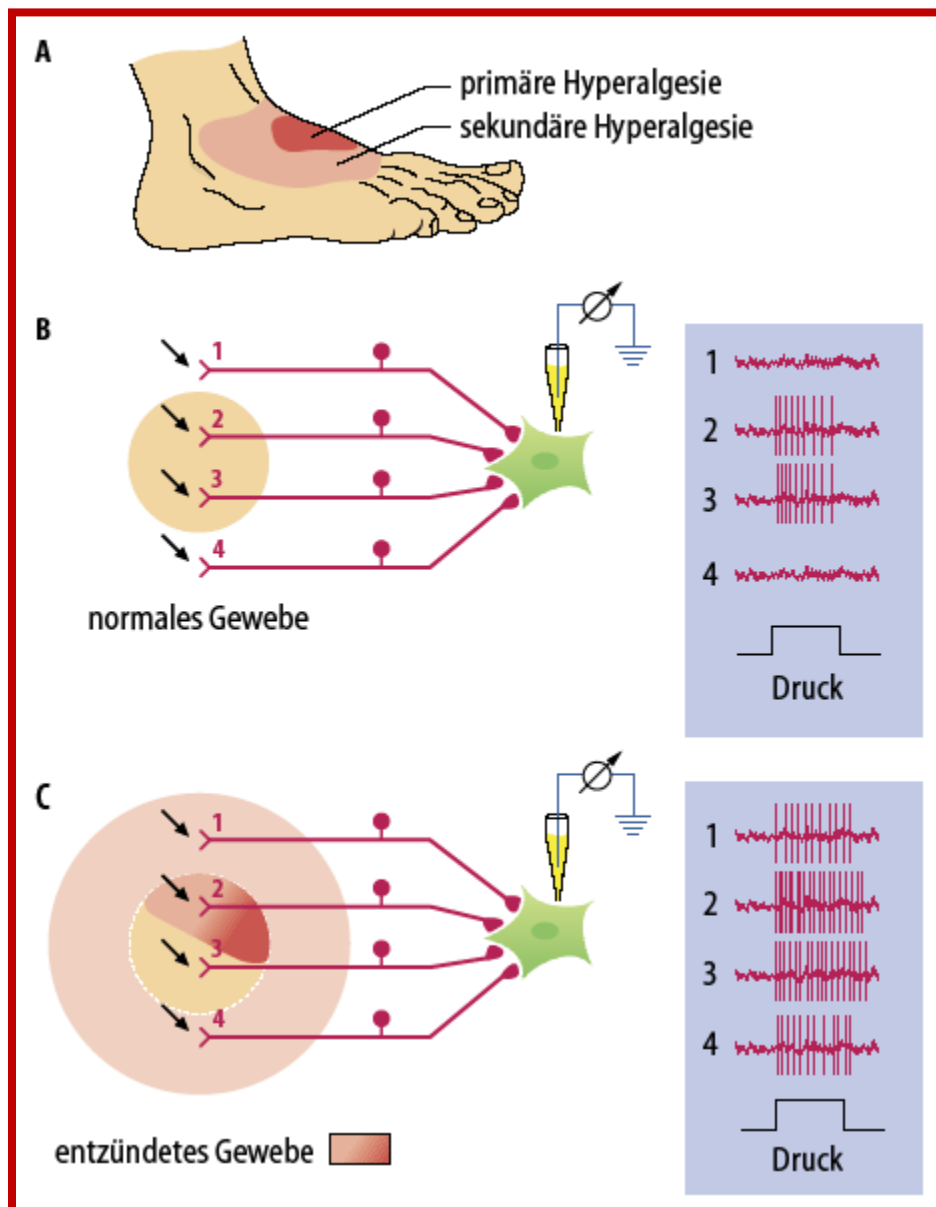
### 2.3.3. Zentrale/spinale Sensibilisierung

Durch die zentrale Sensibilisierung werden die nozizeptiven Prozesse im zentralen Nervensystem und der Schmerz verstärkt. Sie wurde bis dato hauptsächlich bei spinalen Neuronen beobachtet, die wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit sind, weshalb im Folgenden von der **spinalen Sensibilisierung** (siehe Abb. 2.4.B/C) gesprochen wird.

Diese folgt häufig der peripheren Sensibilisierung und führt dazu, dass die spinalen nozizeptiven Neurone empfindlicher werden gegenüber nozizeptiven Zuflüssen, es

kommt zur **Übererregbarkeit des spinalen Neurons** (siehe Abb. 2.5). So nehmen im Verlauf einer Entzündung die Antworten der Rückenmarkneurone zu auf Reize im entzündeten Gewebe und auch im gesunden Nachbargewebe. Dadurch bedingt wird das neuronale rezeptive Feld größer (siehe Abb. 2.6), welches das Areal darstellt, von dem eine Nervenfasern durch noxische Stimuli reizbar ist, und es kommt konsekutiv zur **sekundären Hyperalgesie** (siehe Abb. 2.4.A), also zur erhöhten Schmerzempfindlichkeit im eigentlich gesunden Umgebungsgewebe.

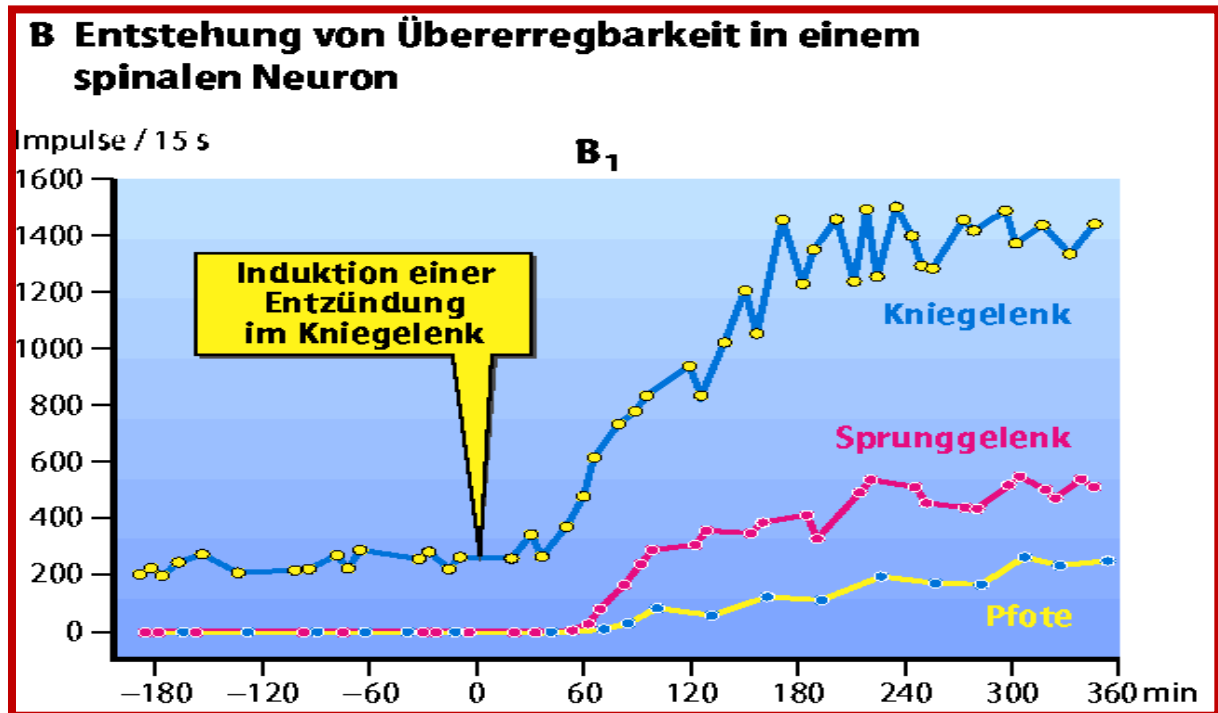
Die Antwortzunahme der spinalen Neurone ist präsynaptisch bedingt durch die vermehrte Freisetzung vom Neurotransmitter Glutamat und von Neuropeptiden, wie Substanz P und CGRP aus den nozizeptiven Endigungen, und postsynaptisch bedingt durch die Aktivierung von Alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA)-Rezeptoren und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren in den Rückenmarkszellen.



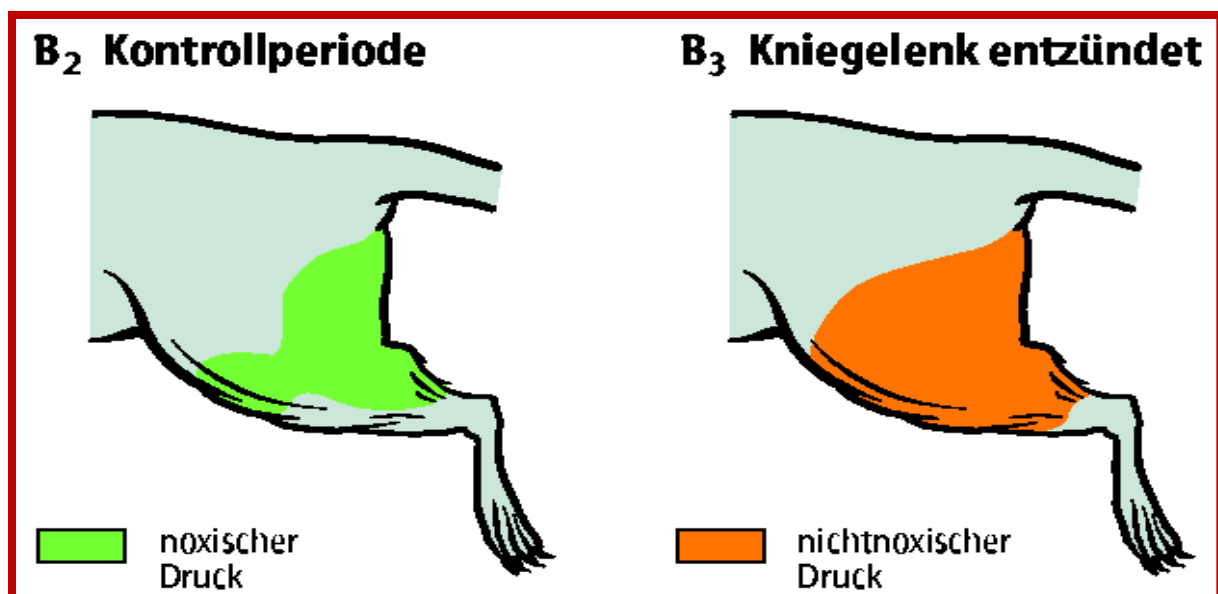
**Abb. 2.4.A** Zonen der primären Hyperalgesie, die dem Ort der Läsion entspricht und der sekundären Hyperalgesie, die gesundem Gewebe entspricht.

**Abb. 2.4.B** Der Kreis entspricht dem rezeptiven Feld (RF) vor Entzündung, auf noxischen Druck im RF werden Aktionspotentiale (AP) ausgelöst, auf noxischen Druck der Punkte 1 und 4 nicht.

**Abb. 2.4.C** Sensibilisierung eines nozizeptiven Rückenmarkneurons bei Entzündung mit nachfolgender Zunahme der AP-Frequenz und Vergrößerung des RF, so dass auch bei Reizung von den Punkten 1 und 4 AP ausgelöst werden (H.-G. Schaible (2010)).



**Abb. 2.5** Sensibilisierung eines spinalen Neurons (WDR-wide dynamic range Neuron) nach Entzündung im Kniegelenk. Gesteigerte Aktivität aus Afferenzen aus Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote (Schmidt/Lang/Thews (2005)).



**Abb. 2.6** Sensibilisierung eines spinalen Neurons (WDR) nach Entzündung im Kniegelenk. Nach Induktion der Entzündung wirken auch nicht-noxische Reize aus dem markierten Bereich erregend auf das spinale Neuron, im Sinne einer Erweiterung des rezeptiven Feldes (Schmidt/Lang/Thews (2005)).

### **2.3.4. Grundlagen des Gelenkschmerzes**

Der Gelenkschmerz gehört zu dem Schmerz, der von den meisten Patienten beklagt wird. Neben Verletzungen zählen die akute und chronische Arthritis zu den häufigsten Ursachen. Ein Beispiel hierfür ist die rheumatoide Arthritis oder die zumeist im Alter aufgrund von Gelenkverschleiß auftretende Osteoarthritis. Neben der Gelenkzerstörung durch entzündungsbedingte Destruktion von Knorpel und Knochen treten chronische Schmerzen auf, die den betroffenen Patienten einen hohen Leidensdruck verschaffen. Bis dato ist die Ursache für die rheumatoide Arthritis noch nicht geklärt. Als Ursachen werden genetische Ursachen, Infektionserreger und ein geschwächtes Immunsystem diskutiert (Hammer, M. (2004)). Das neurophysiologische Korrelat für die Gelenkentzündung zeigt sich in einer gesteigerten Aktionspotentialfrequenz in den vom Gelenk ausgehenden afferenten Neuronen (siehe Abb. 2.5). Grund hierfür sind die in Kapitel 2.3.2/2.3.3 beschriebenen Mechanismen der peripheren Sensibilisierung mit erhöhter Sensibilität der Gelenknozizeptoren auf mechanische Stimulation und der zentralen Sensibilisierung mit erhöhter Sensibilität der nozizeptiven Reize aufnehmenden afferenten Neuronen. Im Rahmen der Entzündung kommt es zur Vergrößerung des rezeptiven Feldes (siehe Abb. 2.6). Hierbei erweitert sich der Bereich des entzündeten Kniegelenkes, von dem aus ein bestimmtes Rückenmarkneuron aktiviert wird, um den Bereich des Sprunggelenkes und der Pfote der Versuchstiere.

### **2.3.5. Entzündungsmediatoren**

Entzündungsmediatoren sind chemische Stoffe, die bei Entzündungen freigesetzt werden. Diese übernehmen die Aktivierung und Sensibilisierung von afferenten Nervenfasern. Sie sind kurzlebig und zerfallen rasch, werden enzymatisch abgebaut oder inhibiert.

Ein wichtiger Entzündungsmediator ist das Bradykinin, ein von alpha2-Globulinen durch Kallikrein abgespaltenes Nonapeptid, welches im Plasma zirkuliert, an Orten von Gewebsverletzungen aktiviert wird und in großer Menge in Entzündungsexsudaten enthalten ist. Synthetisiert wird es in der Leber aus

Prokininen. Neben der Wirkung auf die glatte Muskulatur und Epithelzellen stimuliert es die nozizeptiven Neurone. In der Haut werden hauptsächlich die Nozizeptoren der Gruppe IV-Fasern erregt, in Gelenken und Muskulatur sind die Gruppe IV-Fasern und Gruppe III-Fasern gleichermaßen sensibel für Bradykinin (Manning DC (1991)). Zusätzlich zur direkten Nozizeptoraktivierung sensibilisiert Bradykinin die nozizeptiven Nervenendigungen für andere, einschließlich physikalischer Stimuli.

Eine wichtige Rolle in der mit der Entzündung assoziierten Hyperalgesie, der Reizschwellenerniedrigung mit nachfolgend verstärkter Schmerzempfindung bei nozizeptiver Reizung, spielt die große Familie der Arachidonsäure-Metaboliten (Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene). Sie aktivieren den Nozizeptor direkt und sensibilisieren ihn vor allem für natürliche Reize und andere endogene chemische Stoffe (Rang HP (1994)).

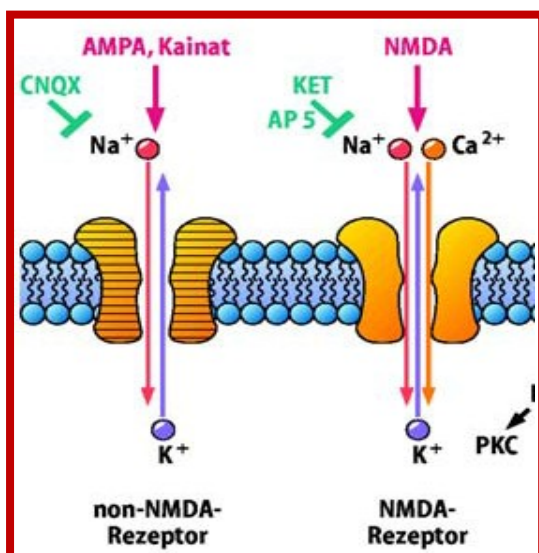
Zusätzlich hat der in entzündetem Gewebe vorhandene niedrige pH-Wert zu der Annahme geführt, dass eine lokale Azidose an der Entstehung von Schmerz und der Hyperalgesie, einer Erniedrigung der Reizschwelle zur Erzeugung von Schmerzen und verstärkter Schmerzempfindung bei schmerzhaften Reizen, beteiligt ist (Steen KH et al (1992)).

### **2.3.6. Transmitter**

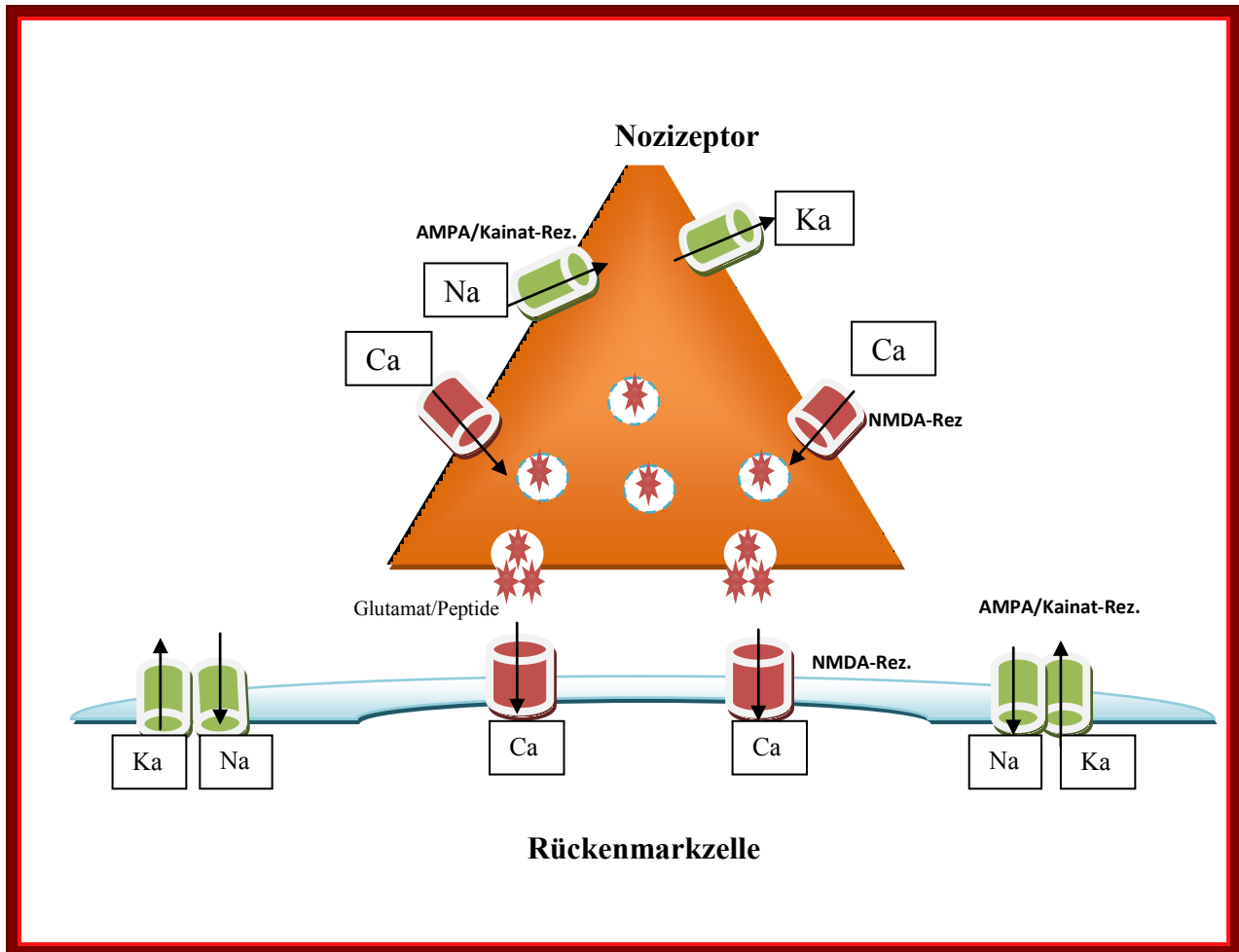
#### **Exzitatorische Transmitter**

Im Rahmen der Nozizeption leiten primär afferente Schmerzfasern ihre Signale zu den äußeren Neuronen des dorsalen Rückenmarks (Laminae I und II). Als exzitatorische Transmitter synthetisieren primär afferente Neurone den Neurotransmitter Glutamat und die Neuropeptide Substanz P und CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) (siehe Abb. 2.9). Ihre Wirkung wird bei Substanz P über einen Tachykinin-Rezeptor, NK1, und bei CGRP über einen CGRP-Rezeptor erzielt (Guard S, Watson SP (1991)). Wenn die im Axon entstandenen Aktionspotentiale am zentralen Neuronenende ankommen, werden die Neuropeptide zusammen mit Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt (Siehe Abb. 2.9). Substanz P und CGRP können aber auch an peripher sensorischen Endigungen freigesetzt werden

und eine neurogene Entzündung bewirken. Der wichtigste Transmitter **Glutamat** wirkt mittels Bindung an postsynaptischen Glutamat-Rezeptoren, die nach ihren Agonisten und Antagonisten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Dazu gehören die Gruppe der NMDA-Rezeptoren und die der Non-NMDA-Rezeptoren (siehe Abb. 2.8). Zur zweiten Gruppe gehört der AMPA-Rezeptor. Glutamat bewirkt in niedrigen Konzentrationen, die auftreten, wenn nur selten Aktionspotentiale an den zentralen Endigungen der C- und A $\delta$ -Fasern ankommen, nur die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren. Die NMDA-Rezeptoren werden in dieser Situation blockiert von Magnesiumionen und können so nicht aktiviert werden. Bei einer dauerhaften Schmerzfasernaktivität kommt es zu einer starken Depolarisierung in den Projektionsneuronen, wodurch sich der spannungsabhängige Magnesiumblock löst und die NMDA-Rezeptoren geöffnet werden können. Dies führt postsynaptisch zu einem gesteigerten Calciumionen-Einstrom ins Neuron, wodurch postsynaptisch Second-Order-Neurone aktiviert werden mittels Aktivierung verschiedener Proteinkinasen, calciumabhängiger Phospholipasen und Synthasen, was zur gesteigerten Transkription verschiedener Gene wie z.B. der Cyclooxygenase-2 und damit zur gesteigerten Synthese von proinflammatorischen Prostaglandinen, (PGE<sub>2</sub>), führt. Prostaglandin E<sub>2</sub> spielt unter anderem eine entscheidende Rolle als pronozizeptiver Mediator bei entzündungsbedingten Schmerzen und bedingt eine gesteigerte neuronale Erregbarkeit (Svensson, Yaksh (2002)). Die Zentrale Sensibilisierung kann demnach durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden (H.-G. Schaible (1998)// H.-G.Schaible, Grubb (1993)// Mc Mahon S (1993)// Neugebauer V et al (1993)// Urban L et al (1994)).



**Abb. 2.7** Glutamat-Rezeptoren: NMDA- und nicht-NMDA-Rezeptoren (AMPA-/ Kainat-Rezeptor); sie steuern direkt die Ionen-Kanäle und wirken damit ionotrop. Sie können durch spezifische Rezeptor-Antagonisten blockiert werden (grüne Symbole). Der NMDA-Rezeptor ist für Kalzium durchlässig, wird aber durch Magnesiumionen blockiert (Schmidt/Lang/Thews, Physiologie des Menschen, 29. Auflage, Springer).



**Abbildung 2.8** Synapse mit zentralem Neuronenende als Präsynapse und Rückenmarkszelle als Postsynapse mit synaptischem Spalt dazwischen. Außer Glutamat sind auch Neuropeptide in den Transmittervesikeln enthalten. Diese werden bedingt durch den Calciumeinstrom in das zentrale Neuronenende mit Glutamat in den synaptischen Spalt freigesetzt und sind an der Signalübertragung auf Rückenmarkneurone hauptsächlich über AMPA (🟢)- und NMDA (🔴)-Rezeptoren beteiligt (modifiziert nach Seeburg et Sprengel (2009))

Bei peripheren Entzündungsvorgängen werden die Neuropeptide **Substanz P** und **CGRP** im Rückenmark freigesetzt, wo sie Neurokinin 1- und CGRP- Rezeptoren aktivieren und zu einem Calcium-Einstrom in die Postsynapse führen, was über die Aktivierung der Phospholipase A2 (PLA2) und der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) die Synthese von Transmittern wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandinen bewirkt. Diese werden aus den Zellen transportiert und sensibilisieren entweder die Erregbarkeit postsynaptischer Projektionsneurone oder erhöhen als retrograde Transmitter die



Transmitterausschüttung an der Präsynapse (Bliss, Collingridge (1993)// Park Y. et al (2000)).

**Substanz P (SP)**, ein sich aus 11 Aminosäuren zusammensetzendes Protein, das sich unter anderem in sensorischen Nervenfaserverendigungen befindet, ist eine der bestuntersuchten Substanzen im Rahmen neurogener Entzündungsvorgänge. Die inflammatorischen Eigenschaften der SP scheinen in erster Linie über eine Interaktion mit dem NK1-Rezeptor vermittelt zu werden (Guard S, Watson SP (1991)), der auf den endothelialen Zellen der postkapillären Venolen lokalisiert ist. Innerhalb von Sekunden der NK1-Rezeptor-Aktivierung durch SP kommt es zur passageren, nur Minuten nachweisbaren Ausbildung von endothelialen Gefäßlücken mit Plasmaaustritt (McDonald DM et al (1996)). SP hat eine hohe Bindungsaffinität an Monozyten und Makrophagen und stimuliert deren Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Lucey DR et al (1994)).

Wie SP ist auch **CGRP** ein weiteres wichtiges proinflammatorisches Neuropeptid, das aus den freien Nervenendigungen freigesetzt wird. Es ist als Transmitter am CGRP1-Rezeptor an der neurogenen Entzündung beteiligt und bewirkt dabei eine Dilatation der Arteriolen im Gegensatz zum SP, welches die Permeabilität der Venolen erhöht (Holzer P (1998)). Dadurch ruft es ein entzündliches Hauterythem hervor, kann jedoch als alleiniger Transmitter keine Schmerzempfindung hervorrufen (Pedersen-Bjergaard U et al (1991)).

Prostaglandine, besonders PGI<sub>2</sub>, können in höherer Dosierung eine direkte SP- und CGRP-Freisetzung aus den sensorischen Nervenendigungen in embryonalen Rattenherzen auslösen (Hingtgen CM, Vasko MR (1994)).

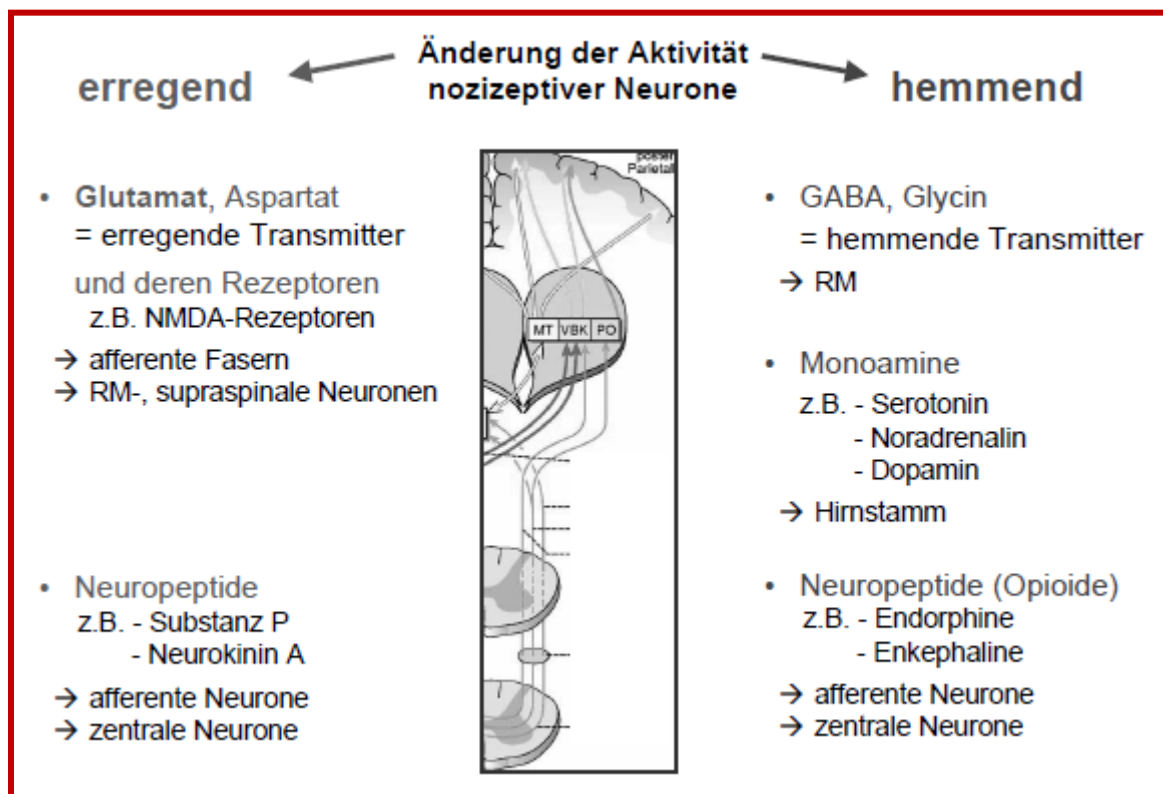
Neben den Tachykininen SP und CGRP spielen auch das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) und Somatostatin eine Rolle in der Entstehung der neurogenen Entzündung in der Haut, vor allem in der Vermittlung von Immunzellfunktionen (Scholzen T et al (1998)).

Von Bedeutung bei der neurogenen Entzündung ist auch der nerve growth factor (NGF), der im Rahmen inflammatorischer Prozesse in erhöhter Konzentration nachweisbar ist (Woolf, C.J. (1996)), was möglicherweise durch die direkte Sensibilisierung der Nozizeptoren, den Anstieg von SP und CGRP und andere lokale Effekte, wie der Histaminfreisetzung aus Mastzellen, eine Hyperalgesie hervorruft

(Anand P (1995)). Im Tiermodell führt NGF-Entzug zu einer reduzierten Expression von SP und CGRP und einer damit einhergehenden verminderten Funktion der Hautnozizeptoren.

### Inhibitorische Transmitter

Neben der Aktivierung durch Schmerzfasern mittels Depolarisation können die vorseitig genannten Projektionsneurone auch durch Signale inhibitorischer Interneurone hyperpolarisiert werden. Als inhibitorische Transmitter werden von Interneuronen ausgeschüttet und fungieren GABA und/oder Glycin und hemmende Neuropeptide wie Enkephalin, sowie Monamine wie Serotonin und Noradrenalin (siehe Abb.2.9).



**Abbildung 2.9** Nozizeptoraktivierung/- Hemmung (Deetjen/Speckmann, Physiologie 1999, Urban & Fischer)

## **2.4. I $\kappa$ B-Kinase vermittelte Entzündungskaskade**

### **2.4.1. Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B**

Bei Entzündungen ist der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) einer der wichtigsten intrazellulären Mediatoren. Er kommt in nahezu allen Zelltypen und Geweben vor und kann über seine Bindung an regulatorische Abschnitte der DNA die Transkription von Genen beeinflussen und ist damit entscheidend für die Regulation des Zelltodes, der Zellproliferation, der Immunantwort und für akute und chronische Entzündungen. Neuere Daten legen nahe, dass viele verschiedene Tumorerkrankungen charakterisiert sind durch eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B, welcher durch seine anti-apoptotische Funktion zum Überleben der malignen Tumorzellen führt (Schmid J et al (2008)).

Bei NF- $\kappa$ B handelt es sich um verschiedene Proteine, wobei jeweils zwei in unterschiedlichen Kombinationen an einander binden und damit ein Dimer bilden. Dazu gehören NF- $\kappa$ B 1 (p50 aus dem Vorläuferprotein p105 entstanden), NF- $\kappa$ B 2 (p52 aus p100), Rel-A (p65), Rel-B und c-Rel. In den meisten Zelltypen, ausgenommen B-Lymphozyten und dendritischen Zellen, liegt NF- $\kappa$ B im Zytoplasma in inaktiver Form vor ohne Zugang zur im Zellkern liegenden DNA. Gehemmt wird es durch seine Bindung an inhibitorische  $\kappa$ B-Proteine (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Charakteristisch für NF- $\kappa$ B ist seine schnelle Aktivierung wenige Minuten nach Stimulation, da es funktionsbereit im Zytoplasma vorliegt und seine geringe Spezifität, da die unter seiner Kontrolle stehenden Gene sehr zahlreich sind. Zu den unter NF- $\kappa$ B hochregulierten Genen zählen Zytokine, Wachstumsfaktoren wie Interleukine, TNF $\alpha$  bis zum GM-CSF (Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) (Baldwin AS, Jr. (2001)). Diese führen zur Ausbreitung der Entzündung auf andere Zellen. Zu den NF- $\kappa$ B aktivierenden Stimuli gehören infektiöse Agenzien wie Bakterien, Viren und Parasiten mit ihren Produkten, biochemische Reize und zelluläre Mediatoren wie Zytokine (TNF, IL-1, IL-2), Wachstumsfaktoren und Hormone, physikalischer Stress wie UV-Strahlung und  $\gamma$ -Strahlung und oxidativer Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder O<sup>2-</sup> und TNF $\alpha$  (Thanos D, Maniatis T. (1995)// Karin M, Ben-Neriah Y (2000)).

### 2.4.2. I $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B liegt im Zytoplasma gebunden an die inhibitorische Untereinheit I $\kappa$ B vor. Bis dato konnten hier sieben verschiedene I $\kappa$ B-Moleküle identifiziert werden: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100 und p105 (Scheidereit C (1998)). Am besten analysiert ist bis heute I $\kappa$ B $\alpha$ , welches die Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern hemmt. Durch die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  wird die Degradierung des Inhibitormoleküls eingeleitet, die Ubiquitinierung erfolgt und die Degradierung des Proteasoms geschieht (Rice NR, Ernst MK (1993)).

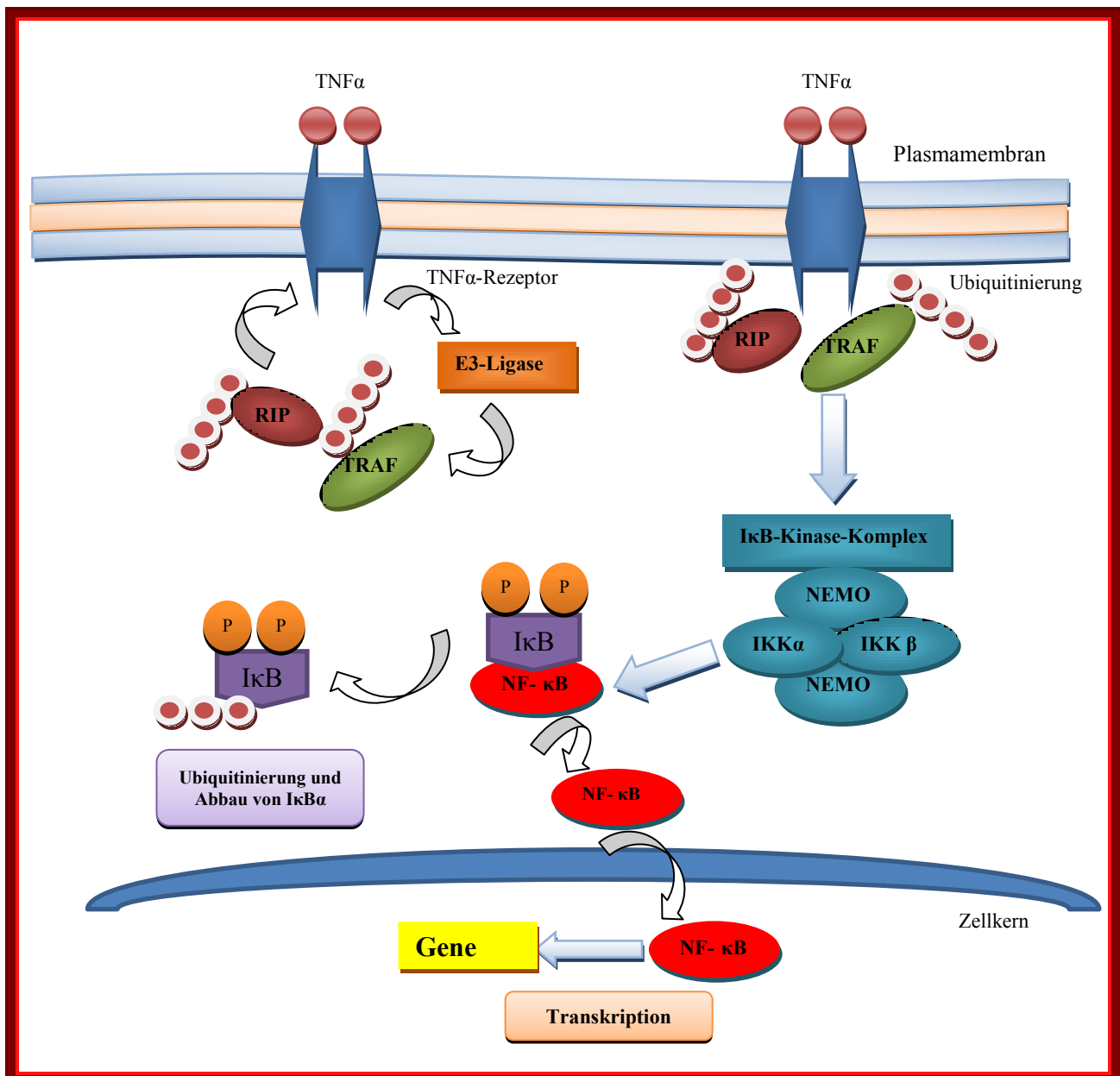
### 2.4.3. IKK-Komplex

Zu dem zur Degradation von I $\kappa$ B führenden Kinasen-Komplex gehören NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) und NIK (NF- $\kappa$ B-induzierende Kinase). Wobei NEMO an der Bildung des IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ -Komplexes beteiligt ist und IKK $\gamma$  genannt wird, und NIK IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  aktiviert. Die IKK besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, der IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ , von denen beide in der Lage sind, I $\kappa$ B zu phosphorylieren (Baeuerle PA (1998)). Dies hat zur Folge, dass der dimere Komplex in NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B zerfällt. IKK $\beta$  steigert die Zellproliferation, Zellmigration und die TNF $\alpha$ -induzierte Zellmetastasierung, nachgewiesen vor allem bei Brustkrebs. Die IKK $\beta$ /IKBKB (I $\kappa$ B-Kinase beta), auch IKK2 genannt, bekam ihren Namen von ihrer Funktion, der Phosphorylierung von I $\kappa$ B mit anschließender Freisetzung von NF- $\kappa$ B. Stimuli hierfür sind neben inflammatorischen Zytokinen, Endotoxine oder virale Infektionen. IKK $\alpha$  wiederum führt über die Phosphorylierung des onkogenetischen Transkriptionsfaktors  $\beta$ -Catenin zur gesteigerten Tumorphosphorylierung. Ihre Beteiligung wurde bisher sowohl bei Brust- und Prostata-Karzinomen nachgewiesen. Zu den IKK-verwandten Kinasen zählt die IKK $\epsilon$ , welche ein wichtiger Mediator bei antiviralen Antworten und zusammen mit IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  die Immunabwehr koordiniert. Sie scheint ferner beteiligt zu sein an der Synovitis und Gelenkzerstörung bei rheumatoider Arthritis und bei der Tumorinvasion und Metastasierung über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, nachgewiesen bei Brustkrebs (Lee et Hung (2008)).

#### 2.4.4. NF- $\kappa$ B-Signalweg

Der NF- $\kappa$ B-Signalweg (siehe Abb. 2.10) spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von entzündungsbedingten Schmerzen. Für chronische Entzündungen, wie den Arthritiden, macht man Störungen des NF- $\kappa$ B-Signalwegs verantwortlich (Tegeder et al (2001)). Nach einer nozizeptiven Stimulation bei einer peripheren Entzündung kommt es sowohl im peripheren als auch zentralen Nervensystem zur Ausschüttung von Schmerzmediatoren wie Zytokinen, Prostaglandinen und Glutamat. Diese wiederum können die NF- $\kappa$ B-Kaskade starten. Sie kann z.B. durch Signalmoleküle wie das Zytokin TNF (Tumornekrosefaktor) aktiviert werden. Dieser bindet an seinen TNF-Rezeptor an der Zellmembran, was zu dessen Konformationsänderung und dadurch bedingt zu einer intrazellulären Rekrutierung der E3-Ligase TRAF 2 an den Rezeptor führt. Somit wird eine Poly-Ubiquitinierung der Proteine TRAF 2 und RIP erreicht, wodurch phosphorylierende Enzyme aktiviert werden, z.B. die IKK $\beta$  (Meylan E, Tschopp J (2005)).

Nach Aktivierung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinase-Komplexes (IKK), der die Phosphorylierung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteine bewirkt und damit zum nachfolgendem Zerfall des dimeren Komplexes führt, wandern die von ihren Inhibitoren freigesetzten NF- $\kappa$ B-Moleküle aus dem Zytosol in den Zellkern, um ihre Transkriptionsfunktion zu übernehmen, die zur Ausbreitung der Entzündung auf andere Zellen führen. Währenddessen wird I $\kappa$ B $\alpha$  rasch von Proteasen resynthetisiert, um erneut für die inhibitorische Kontrolle von NF- $\kappa$ B zur Verfügung zu stehen. Die NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65 binden im Zellkern an die entsprechenden Promotor-Regionen von Genen, die zur Aktivierung der Transkription immunologischer und inflammatorischer Gene führen. Damit induziert NF- $\kappa$ B verschiedene Gene, die für die Entstehung und Verstärkung von Entzündungsprozessen, für die Akute-Phase-Reaktion, angeborene immunologische Prozesse und die Hemmung der Zellapoptose verantwortlich sind. Hierzu gehören proinflammatorisch-regulierende Gene wie Wachstumsfaktoren, Chemokine, Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , etc.), Enzyme (COX-2, iNOS) und verschiedene zelluläre Rezeptoren (Akira S, Kishimoto T (1997)). Einige von diesen, wie die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6, sind jedoch auch selbst in der Lage, NF- $\kappa$ B zu aktivieren, mit der Folge eines sich selbst amplifizierenden Zyklus (Baldwin AS, Jr (1996)).



**Abb. 2.10** Die Stimulation der Oberflächenrezeptoren durch verschiedene Induktoren führt zur Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes, der aus den beiden Kinasen IKKα und IKKβ und der regulierenden Subunit NF-κB-essential modulator (NEMO) zusammengesetzt ist. Die IKK phosphoryliert den Inhibitor von κB (IκB), was zu dessen Ubiquitinierung und nachfolgender Degradation führt. Das freigesetzte NF-κB, bestehend aus p50 und p65, transloziert in den Zellkern und bewirkt die Transkription verschiedener Gene. (● Ubiquitin)  
(modifiziert nach McConkey, Keyi Zhu)

Bei der Generierung von entzündlichen Prozessen ist wesentlich die Rekrutierung von Monozyten, Granulozyten und T-Lymphozyten an den Ort der Entzündung aus dem Blutkreislauf. Hierzu werden bestimmte Adhäsionsmoleküle exprimiert, angestoßen durch die lokale Aktivierung von NF-κB durch immunologische und

entzündliche Reize. Hierbei wird eine Stressreaktion durch Reactive Oxygen Intermediates (ROIs) ausgelöst und das proinflammatorische Enzym inducible Nitric Oxidase Synthase (iNOS) aktiviert. Das Produkt Stickoxid der iNOS kann wiederum NF- $\kappa$ B in Lymphozyten aktivieren. In Endothelzellen allerdings kann Stickoxid die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF $\alpha$  blockieren, erklärbar durch gleichzeitige Induktion von I $\kappa$ B $\alpha$  (Guo S et al (2000)).

Bei vielen chronisch entzündlichen Prozessen konnte eine vermehrte Expression des von NF- $\kappa$ B induzierbaren iNOS-Enzyms nachgewiesen werden:

- Bei der rheumatoiden Arthritis in Synoviazellen
- Bei der Arteriosklerose
- Bei Asthma in den Epithelzellen der Atemwege und in Makrophagen
- Bei der Colitis ulcerosa in den Epithelien der Kolonschleimhaut

Die p50-Subunit von NF- $\kappa$ B ist sowohl bei dem akuten als auch bei dem persistierenden Entzündungsschmerz von entscheidender Rolle. Die Beteiligung am chronischen Entzündungsschmerz beruht wahrscheinlich auf der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch inflammatorische Stimuli. Beim akuten Entzündungsschmerz beruht die Mitwirkung am ehesten auf der Grundaktivität von NF- $\kappa$ B in Neuronen des nozizeptiven Systems (Niederberger E et al (2007)).

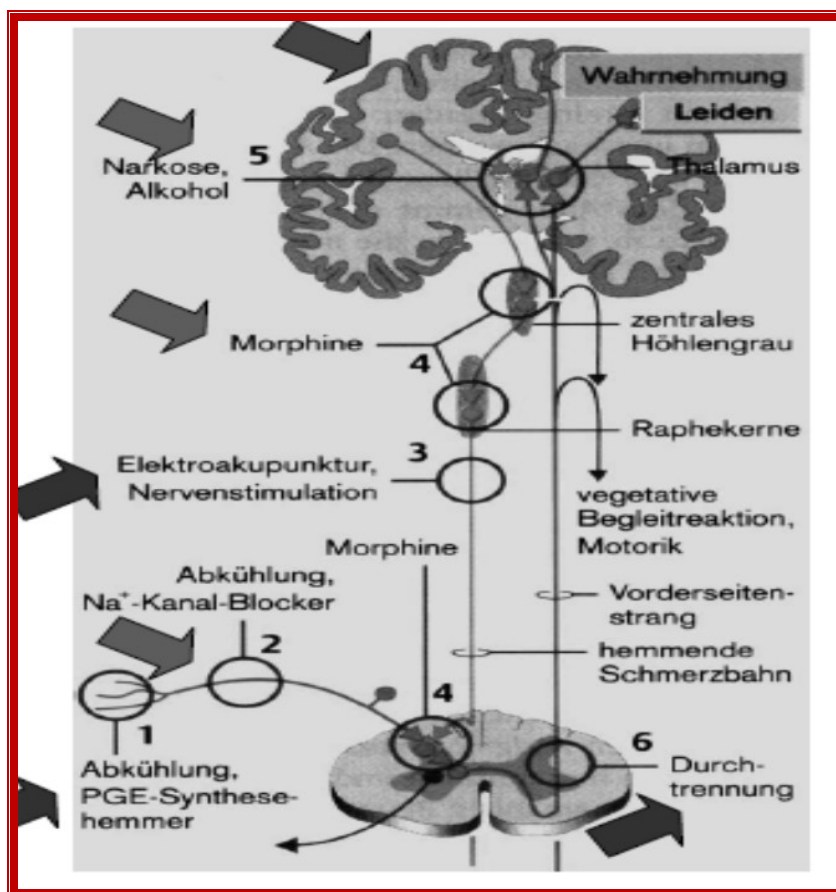
Eine weitere entscheidende Rolle nimmt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B über den TNF-Rezeptor-1 ein mit Folge einer antiapoptotischen Funktion (Choi M et al (2003)).

## **2.5. Therapiemöglichkeiten**

Akute Schmerzen, die den akuten nozizeptiven Schmerzen entsprechen, lassen sich in der Regel gut mit Analgetika therapieren, da sie kurzfristig mit Beseitigen der Ursache nachlassen. Bei chronischem Schmerz, der sowohl ein chronischer nozizeptiver Schmerz als auch ein neuropathischer Schmerz sein kann, kann es zu sekundären Veränderungen im ZNS kommen. Der chronische Schmerz macht einen großen Teil der Schmerzen aus. Die Patienten reagieren oft therapieresistent auf

Analgetika, so dass mehr und mehr die multimodale Schmerztherapie angewendet wird. Dazu gehören:

- Analgetika, die nach den Stufenschemata der WHO eingesetzt werden sollten
- Psychopharmaka und Antikonvulsiva
- Physikalische Therapie mit Wärme-/Kältetherapie, Elektrotherapie, Massage
- Psychologische Verfahren wie Biofeedback, Meditation
- Strahlentherapie
- Lokal- und Regionalanalgesie
- Verfahren der Gegenirritation wie TENS und Akupunktur
- Sympathikusblockade
- Rückenmarknahe Therapie mittels Pumpen und Ports



**Abb. 2.11** Die multimodale Schmerztherapie (Silbernagel/Lang, Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme 1998)



### 2.5.1. Analgetika

Gemeinsam ist allen Analgetika, dass sie die Erregbarkeit von Neuronen im nozizeptiven System reduzieren.

#### 2.5.1.1. NSAR

Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) gehören zu den weltweit am häufigsten verwendeten Medikamenten. Sie werden als schwach wirksame Analgetika eingestuft und vor allem beim **Entzündungsschmerz**, wie bei der rheumatoiden Arthritis, verordnet. Bereits 1971 konnten Vane et al. (Vane, J. R. (1971)) zeigen, dass deren Wirkung auf einer Blockade von den Enzymen Cyclooxygenasen (COX) beruht. Diese sind beteiligt an der Bildung von Prostaglandinen aus von Membranphospholipiden freigesetzter Arachidonsäure. Da Prostaglandine sowohl zu den Entzündungsmediatoren zählen als auch Nozizeptoren direkt über Prostaglandinrezeptoren aktivieren, können COX-Hemmer sowohl zur Hemmung des Entzündungsprozesses als auch zur Hemmung der peripheren Sensibilisierung durch Senken der Prostaglandin-Gewebekonzentration eingesetzt werden. Cyclooxygenasen kommen auch im Rückenmark vor und in Primärafferenzen, so dass sie über Prostaglandine an der zentralen Sensibilisierung beteiligt sind. NSAR wirken deshalb auch im zentralen Nervensystem (H.-G. Schaible (2010)//Hardmann, Limbird (1996)// Vane, J. R. et al (1998)// McCormack K & Brune K (1991)).

Cyclooxygenasen kommen in drei Isoformen vor, COX-1, COX-2 und COX-3, wobei über die letzte nicht viel bekannt ist. In vielen Organen ist die COX-1 beteiligt an der Produktion protektiver Prostaglandine, die z.B. im Gastrointestinalsystem, in Nieren, Gefäßen, Lunge, Milz und Thrombozyten gebraucht werden. Prostaglandine sind hier beispielsweise am Schutz der Magenschleimhaut und an der normalen Nierenfunktion beteiligt (Tegeder et al, (2000)).

Die COX-2 hingegen ist hauptsächlich an der Synthese von Prostaglandinen im Rahmen von Entzündungsprozessen beteiligt. Sie wird vermehrt ausgeschüttet durch im Entzündungsgebiet freigesetzte Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mitogene und führt deshalb lokal zur verstärkten Produktion von Prostaglandinen, was zu den

typischen Entzündungssymptomen einschließlich zur Sensibilisierung der Nozizeptoren führt (Nantel et al (1999)).

Außerdem hat sie physiologische Aufgaben, wie die Nierendurchblutung oder Wundheilung zu sichern.

Die **klassischen NSAR** wie Ibuprofen und Aspirin blockieren beide COX. Dies führt neben den gewünschten analgetischen, antipyretischen und antiphlogistischen Wirkungen zu den bekannten Nebenwirkungen der klassischen NSAR wie gastrointestinalen Komplikationen, Auftreten oder Verschlechterung einer Niereninsuffizienz und kardialen Komplikationen (Bombardier, C. (2002)). Die neuen, selektiven COX-2-Inhibitoren, **Coxibe**, blockieren nur die COX-2, so dass eine gezieltere Hemmung der pathologischen Prostaglandinsynthese erzielt werden konnte (Ryseck, R. P. (1992)). Coxibe verdrängen wie die klassischen NSAR die Arachidonsäure vom aktiven COX-2-Zentrum über Wasserstoffbrückenbindung an diesem. Sie passen gut an den hydrophoben Teil der COX-2, können jedoch bei der COX-1 nicht zum aktiven Zentrum vordringen (Brune, K. & Hinz, B. (2004)).

Dabei können unerwünschte Nebenwirkungen auch hier nicht ausgeschlossen werden, da die COX-2 nicht, wie zunächst angenommen, nur an entzündlichen Prozessen beteiligt ist, sondern zum Teil auch protektiv wirkt in Rückenmark, Nieren und Uterus (Vane, J. R. et al (1998)). Ein weiteres Problem der COX-2-Hemmer ist, dass sie zur Thrombozytenaggregation und begleitenden Vasokonstriktion führen mit deutlich erhöhtem Thromboserisiko. Deshalb sollten sie nicht bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit eingesetzt werden. Auch die älteren NSAR erhöhen das kardiovaskuläre Risiko generell ca. auf das 1,77-Fache (Beubler E (2007)).

Die Effektivität der NSAR ist limitiert, da sie nur Prostaglandine, aber keine anderen Entzündungsmediatoren beeinflussen, nicht alle nozizeptiven Afferenzen durch Prostaglandine beeinflusst werden und Schmerz auch unabhängig von Prostaglandinen und Entzündungsvorgängen ausgelöst werden kann.

### 2.5.1.2. Opioide

Ist eine Therapie mit NSAR nicht oder nur wenig erfolgreich und der afferente nozizeptive Input nicht zu senken, ist eine zusätzliche Option die **Opioid-Therapie** mit **zentralem Angriffsziel**, den zentralen Neuronen (H.-G. Schaible (2010)// Allan L, Zenz M (1997)// Dickenson A H (1994)). Man unterscheidet schwach wirksame Opioide wie Tramadol von stark wirksamen wie Oxycodon, Morphin und Hydromorphon. Sie blockieren präsynaptisch an den zentralen Endigungen afferenter Neurone die Transmitterfreisetzung und wirken über  $\mu$ -,  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren. Über ein GTP-bindendes Protein blockieren die Rezeptoren die Öffnung der präsynaptischen Calciumkanäle, was den Calciumeinstrom verhindert und die Transmitterfreisetzung blockiert mit daraus resultierender Blockade der Signalweiterleitung. Bei der analgetischen Wirkung sind alle drei Rezeptoren beteiligt. Bei den typischen Nebenwirkungen Sedierung und Atemdepression sind nur die  $\mu$ - und  $\kappa$ -Rezeptoren beteiligt. Für das Suchtpotential werden die  $\mu$ -Rezeptoren verantwortlich gemacht. Bis dato konnte keine Substanz entwickelt werden, die nur die  $\delta$ -Rezeptoren besetzt und so die Nebenwirkungen vermeidet (Beubler E (2007)). Außerdem blockieren Opioide postsynaptisch Rückenmarkneurone durch Hyperpolarisation und führen außerdem zur Aktivierung der deszendierenden Hemmung. Sie sind gerade beim alten Patienten gut einsetzbar in Form von transdermalen Systemen wie Durogesic/-Fentanylpflastern. Der Nachteil hierbei liegt in der potentiellen Toleranz und psychologischen Abhängigkeit der Opioide bei Nichteinhalten eines strengen Applikationsschemas.

Auch bei der Regionalanästhesie werden zum Teil Opioide eingesetzt. Hierzu gehören die häufig in Chirurgie und Orthopädie angewendete *Infiltrationsanalgesie* in Form der Epiduralanästhesie bei chronischen Beschwerden der Lendenwirbelsäule und *periphere Nervenblockaden* wie der 3-in-1-Block bei Operationen der unteren Extremitäten, z.B. bei Implantation von Knieendoprothesen.

### 2.5.1.3. NF-κB-Blockade

Da **NF-κB** erheblich an der Aktivierung und Verstärkung von entzündlichen Prozessen beteiligt ist, sollte durch dessen Blockierung eine breite antiphlogistische Wirkung zu erreichen sein. Als Inhibitoren für NF-κB sind bekannt neben **Glukokortikosteroiden** Antiphlogistika wie **Acetylsalicylsäure**, Pentoxiphyllin und Sulfasalazine. Eine Blockade von NF-κB spielt auch eine entscheidende Rolle beim B-Zell-Lymphom zum Ausbleiben von apoptotischen Zelltod, der klonalen Zellproliferation und der malignen Transformation in B-Lymphozyten.

### 2.5.1.4. Blockade von Calciumkanälen

Eine andere Möglichkeit, die Freisetzung von Mediatoren zu hemmen, besteht in der **Blockierung von Calciumkanälen**, die in die Exozytose von Transmittern involviert sind (Vanegas H, Schaible H-G (2000)). Neben Gabapentin, das den Calciumkanal blockiert, und Opioiden, die den Calciumeinstrom blockieren, wurde **Omega-Conotoxin**, ein hochwirksames Toxin aus dem Gift mariner Kegelschnecken, entdeckt und in der Analgetikatherapie eingesetzt. Es blockiert spezifisch Calcium-Kanäle und verhindert damit den Calciumeinstrom präsynaptisch und die Transmitterfreisetzung. Es wurde eine Schmerzlinderung beobachtet selbst in Fällen, in denen Morphine nicht ausreichend effektiv waren (Frings Stephan (2003)).

### 2.5.1.5. Medikamentöse Hemmung der nozizeptiven Transmission

Die Zentrale Sensibilisierung kann durch NMDA-Rezeptor-Antagonisten bzw. durch Phosphorylierung der AMPA- und NMDA-Rezeptoren herabgesetzt werden (H.-G. Schaible (1998)// H.-G.Schaible, Grubb (1993)// Mc Mahon S (1993)// Neugebauer V et al (1993)// Urban L et al (1994)). Ein Glutamat-Antagonist, der an den NMDA-Rezeptor bindet, ist beispielsweise das Ketamin, ein vor allem in der Anästhesie und Notfallmedizin häufig eingesetztes Narkotikum, welches für wenige Stunden eine Analgesie erzielt.

### 2.5.2. Alternative schmerzreduzierende Medikamente

Die Sensitivität auf externe Schmerzreize oder Verletzungen ist abhängig von unserem physischen oder psychischen Zustand und der Tageszeit. Begründet ist dies durch die unterschiedliche Aktivität unseres endogenen Schmerz-Kontroll-Systems, welches abhängig ist von hemmenden Transmittern wie GABA, Noradrenalin und Serotonin, und auch von **endogenen Opioiden** wie Endorphinen, Enkephalinen und Dynorphin. Endogene Opiode reduzieren den Schmerz durch direkte Blockierung der Exzitation nozizeptiver Neurone und aktivieren damit das Schmerz-Kontroll-System (Fields HL et al (1991)). Über deren Rezeptoren wirken auch die in der Analgetikatherapie eingesetzten Opiode.

Ein ähnlicher Effekt wird durch **Antidepressiva**, **Alpha-2-Adrenozeptor-Agonisten**, wie Clonidin und Triptan hervorgerufen. Hierbei steigt die Konzentration von Noradrenalin und Serotonin im synaptischen Spalt durch Hemmung der Wiederaufnahme dieser Neurotransmitter.

Ferner ist bekannt, dass die analgetische Wirkung nicht nur auf die pharmakologische Wirkung des jeweiligen Medikamentes zurückzuführen ist, sondern ebenso auf den **Placebo-Effekt**, durch den unbewusst das endogene Opioid-System aktiviert wird. Es wird auch angenommen, dass eine positive Wirkung durch therapeutische Manipulation, physikalische Therapie und psychosoziale Therapie in einer placebo-ähnlichen Aktivierung des endogenen Schmerz-Kontroll-Systems begründet liegt.

### 2.5.3. Nicht-medikamentöse Schmerztherapie

Eingesetzt werden bei akuten entzündlichen Erkrankungen ergänzend zu den Analgetika **physikalische Therapiemaßnahmen** mit lokaler Kältetherapie und Ruhigstellung erkrankter Extremitäten, da Nozizeptoren leicht durch mechanische Reize wie Bewegung und Wärme aktiviert werden und durch diese Therapie die Rate sensibilisierter Nozizeptoren reduziert wird.

Sollten sämtliche konservative Therapiemaßnahmen scheitern, bleibt nicht selten nur noch die chirurgische Intervention. So wird nicht selten bei fortgeschrittener

Rheumatoider Arthritis mit Gelenkzerstörung und progredienter Schmerzsymptomatik eine operative Gelenkversteifung vorgenommen oder eine Denervierungsoperation durchgeführt wie die Denervierung den N. interosseus dorsalis bei einer Handwurzelarthrose.

Auch krankengymnastisch unterstützte Bewegungstherapie, Massagen und Akupunktur können eine Verbesserung der Schmerzen bewirken.

Zuletzt ist oftmals eine **psychosoziale Therapie** angeraten, da chronischer Schmerz als Kombination aus Nozizeption und verschiedenen psychologischen und sozialen Einflüssen zu sehen ist.

Die Effektivität psychologischer Schmerztherapie bei Patienten mit chronischen Schmerzen ist belegt. Die Überlegenheit der interdisziplinären Schmerztherapie im Vergleich zur medikamentösen Monotherapie und unbehandelten Kontrollgruppen wurde durch Morley et al nachgewiesen (Morley S (1999)).

## **2.6. Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden,

- welchen Einfluss auf die spinale Übererregbarkeit ein spinal applizierter IκB-Kinase-Hemmer, S 1627, hat, also ob die zentrale Sensibilisierung durch die Hemmung von NF-κB im Rückenmark beeinflusst werden kann und sich damit das neuronale Antwortverhalten ändert,
- ob der spinal applizierte IKK-Hemmer S1627 eine neuronale Wirkung zeigt bei bereits vorliegender neuronaler Entzündung bzw. Übererregbarkeit,
- und ob der spinal applizierte IKK-Hemmer S1627 eine neuronale Wirkung zeigt bei präventiver Gabe der Substanz vor Induktion einer Entzündung.

### **3. Methodik**

#### **3.1. Testsubstanzen**

- **IkappaBkinase - Inhibitor S1627** (S1627, 0,546 ng in 50 µl 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid) + 10 µl NaOH + 940 µl Tyrode; Sanofi-Aventis, Frankfurt/Main)
- **Dimethylsulfoxid** (5 % DMSO = Vehikel für S1627, in Tyrode pH angepaßt auf 8,5 mit NaOH)

#### **3.2. Versuchsvorbereitung**

Zur Versuchsdurchführung waren die folgend aufgeführten Vorbereitungen notwendig.

##### **3.2.1. Herstellung der Carbonfaserelektroden**

Zur extrazellulären Ableitung der Neuronenaktivität wurden glasisolierte Carbonfaserelektroden eingesetzt mit einem Widerstand von ca. 10 – 20 MΩ.

Hierzu wurden vernickelte Kupferspitzen mit Goldsteckern verlötet, anschließend einzelne, mindestens 7 cm lange Carbonfasern jeweils mit den Kupferspitzen mit Silberleitlack verbunden. Ca. 10 cm lange Glaskapillaren (Borosilikatglas, Typ 1103244, Hilgenberg, Malsfeld) wurden dann zur Isolation über die Carbonfasern geführt und mittels handelsüblichen Zweikomponentenklebers mit dem Goldstecker verklebt. In einem speziellen Gerät, Puller (Werkstatt Jena, angelehnt an Narashige, Tokyo), wurden die Glaskapillaren in der Mitte erhitzt und an den Enden durch einen Elektromagneten auseinandergezogen, so dass Elektroden mit Spitzendurchmessern von ca. 5 µm entstanden. Das überstehende Carbonfaserende der einzelnen Elektroden wurde zuletzt unter mikroskopischer Sicht mit 100-300facher

Vergrößerung mit Hilfe einer mit Kaliumdichromat ( $K_2Cr_2O_7$ ) angereicherten Schwefelsäurelösung (0,1 M  $H_2SO_4$ ) bis zum Glasansatz gekürzt. Zuletzt wurde mit einem Impedanzmessgerät der elektrische Widerstand der Elektrode geprüft.

### **3.2.2. Versuchstiere**

Die Experimente erfolgten an 22 männlichen Wistar-Ratten, deren Gewicht 200 – 350 g betrug. Um äußere Einflüsse wie durch den Transport bedingten Stress möglichst gering zu halten, wurden sämtliche Tiere bereits am Nachmittag des Vortages ins Labor gebracht.

### **3.2.3. Narkose und Überwachung von Vitalparametern und Temperatur**

Für die Zeit der Präparation und des Versuchsablaufes wurden die Tiere mit Thiopental (Trapanal<sup>®</sup>, BYK Gulden Ltd, Konstanz) narkotisiert. Dazu wurde zunächst eine Initialdosis von 85-115 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgten im Verlauf Thiopental-Injektionen intraperitoneal mit Dosen von 20-50 mg/kg Körpergewicht. Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurden die Blutdruckwerte und die Kontrolle der Korneal- und Wegziehreflexe, die nicht provozierbar sein sollten, hinzugezogen. Nach Beenden des Versuches wurde über den venösen Katheter eine tödliche Thiopentaldosis von ca. 1g injiziert.

**Thiopental** (Trapanal<sup>®</sup>), auch Pentothal, als Natriumsalz Natriumpentothal, ist ein Hypnotikum aus der Reihe der Barbiturate ohne analgetische Wirkung.

Durch einen Katheter in der A. carotis communis wurde über einen Blutdruckmonitor (Pressure Monitor BP-1, world precision instruments) der Blutdruck kontrolliert.

Die Versuchstiere wurden auf einer Heizdecke gelagert und über einen Temperatursensor mit einem Feedback-Kontrollsystem verbunden (Temperature constanter LIM-60, List-medical-electronic), um die Körpertemperatur während der gesamten Versuchsdauer konstant bei ca. 37°C zu halten und ein narkosebedingtes Auskühlen zu verhindern.



### 3.2.4. Präparation

Im narkotisierten Zustand wurden die Versuchstiere zunächst im Hals- und Rückenbereich rasiert. Nach einem Medianschnitt am Hals wurde die Trachea freigelegt und eine Trachealkanüle zwischen zwei Knorpelspangen eingeführt, über die den Versuchstieren während des gesamten Versuchsablaufes bei Spontanatmung Sauerstoff nahe der Kanüle zugeleitet werden konnte.

Anschließend wurden die Arteria carotis communis und die Vena jugularis externa dargestellt und mit Heparin-Tyrode (12,5 IE Heparin in Tyrode) gefüllte Katheter in die Gefäße eingeführt. Der arterielle Zugang diente zur Blutdrucküberwachung und der venöse Zugang zur abschließenden Applikation einer tödlichen Dosis Trapanal nach Versuchsende. Dieser Eingriff wurde mit dem Hautverschluss beendet.

Nach Setzen eines längsverlaufenden Hautschnittes dorsalseitig über der Wirbelsäule im Lumbalbereich erfolgte die Präparation in die Tiefe unter Ablösung der paravertebralen Muskulatur von der Wirbelsäule.

Dann wurde das Versuchstier in einem stereotaktischen Rahmen fixiert, um Erschütterungen während der Präparation und der Ableitungsphase sowie um eine Beeinflussung durch Atemexkursionen oder den Verlust eines im Versuchsverlauf aufgefundenen Neurons vermeiden zu können. Hierzu musste die Wirbelsäule über die Processi transversi mit Schwanenhalsklemmen am Rahmen fixiert werden. Die beidseitig präparierten Hautlappen wurden am Rahmen angenäht, der Schwanz des Versuchstieres angeklebt und der Kopf über beide äußeren Gehörgänge am Rahmen eingespannt.

Nach Laminektomie unter dem Mikroskop auf Höhe der Wirbelkörper L1-4 mittels Gewebehohlmeißelzange (Luer-Zange) wurde die Dura mater unter mikroskopischer Sicht mit einer feinen Schere vorsichtig eröffnet und entfernt und so das Rückenmark frei gelegt. Dieses wurde dann permanent mit Tyrode feucht gehalten, um eine Austrocknung und Gewebeerstörung zu vermeiden.

Zuletzt wurde das am Rahmen fixierte Versuchstier auf einem schwingungsgedämpften Tisch befestigt, um durch unerwünschte Vibrationen verursachte Ableitungsstörungen zu verhindern.

### **3.3. Registrierung und Aufarbeitung neuronaler Aktivität**

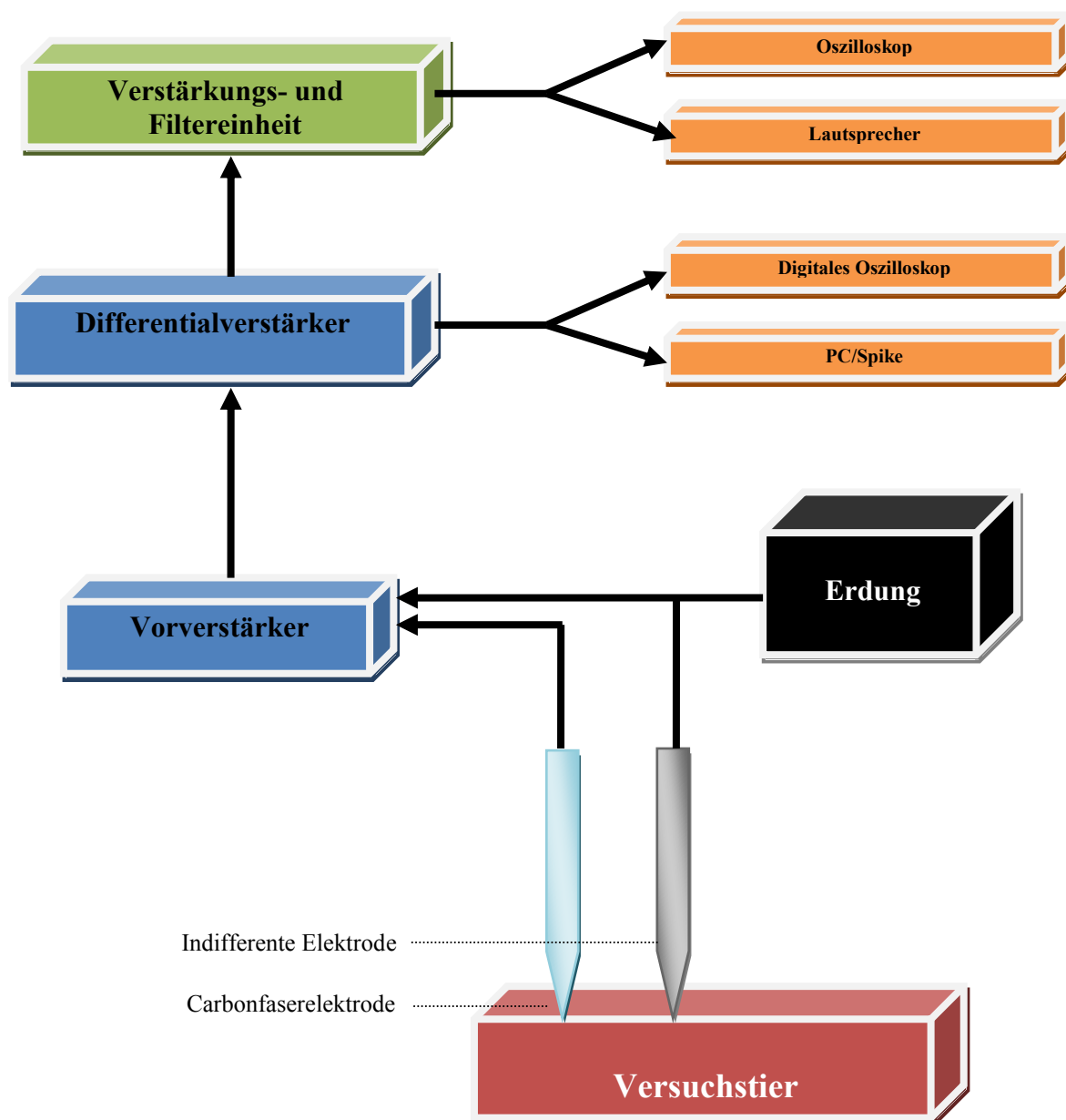
Bei den hier durchgeführten extrazellulären Ableitungen handelte es sich um die Messung von Aktionspotentialen zwischen der Referenzelektrode (indifferente Elektrode) und der Ableitelektrode (differente Elektrode). Die Aktionspotentiale wurden zunächst über einen der Ableitelektrode nahe angeschlossenen Vorverstärker verstärkt, um den Verlust von Signalen gering zu halten. Über manuell zu bedienende Hoch- und Tieffrequenzschalter konnte eine Auswahl der für die Ableitung der provozierten Aktionspotentiale wesentlichen Frequenzen von 300 bis 1000 Hertz getroffen werden. Nach 10000facher Gesamtverstärkung durch einen isolierten Verstärker (1000-fach, ISO-DAM, WPI, New Heaven, USA) und einen Differentialverstärker (10-fach, DAM80-E, WPI) wurden die Signale zu einem weiteren, zur Feinregulation der Amplitudengröße der Aktionspotentiale eingesetzten, regelbaren Verstärker weitergeleitet. Über eine indifferente Elektrode, eine zwischen Thoraxwand und Haut eingebrachte Silberchloridelektrode (WPI), wurde das Ableitsystem geerdet.

Durch Einsatz eines Fensterdiskriminators konnten Aktionspotentiale mit einer bestimmten Amplitudengröße ausgewählt werden und damit die Aufzeichnung auf die Aktivität eines bestimmten Neurons begrenzt werden.

Die gefilterten und verstärkten Signale mit einer Stärke von 10 Volt konnten dann visuell und akustisch dargestellt und wie folgt aufgezeichnet werden. Die visuelle Darstellung erfolgte sowohl auf einem digitalen (Classic 6000, Gould, Eastlake, USA) als auch auf einem analogen (HM305-2, Hameg instruments, Frankfurt) Oszilloskop. Dabei dienten das digitale Oszilloskop der visuellen Echtzeitkontrolle der Aufzeichnung und das analoge der Signalweiterleitung zum oben erwähnten Fensterdiskriminator. Die akustische Darstellung erfolgte durch Lautsprecher. Mittels der 1990 von Handwerker und Forster entwickelten SPIKE/SPIDI-Software gelang über PC die Aufnahme, Speicherung, Diskrimination nach der Form und die Auswertung der abgeleiteten Aktionspotentiale.

Ferner wurden durch das Softwareprogramm M-rate über ein zwischengeschaltetes Interface (CED 1401, Science Park Cambridge, England) Peri-Stimulus-Histogramme auf einen PC zur Kontrolle über die gesamte Versuchszeit sowie zur Erstellung einer Sicherheitskopie für die offline-Auswertung der Daten aufgenommen.

Einen Überblick über Ableitung und Verarbeitung der Aktionspotentiale bietet Abbildung 3.1.



**Abbildung 3.1:** Blockschaltbild zum Versuchsaufbau; Ableitung und Verarbeitung der extrazellulär von Neuronen abgeleiteten Aktionspotentiale

### **3.4. Versuchsablauf**

#### **3.4.1. Eingrenzung und Separierung des Ableitgebietes**

Nachdem die Dura mater eröffnet wurde, wurde in Höhe der Lendenwirbelkörper 1-4 medial der Arteria spinalis posterior mit einer in eine mit elektrischem Schrittmotor gesteuerten Vorrichtung (SMS 87, TC Elektronik, Würzburg) eingespannten Glasfaserelektrode unter mikroskopischer Sicht ins Rückenmark und stufenweise in das Hinterhorn eingegangen bis zu einer maximalen Einstichtiefe von ca. 1200  $\mu\text{m}$ . Simultan erfolgte sowohl die visuelle als auch die akustische Kontrolle der abgeleiteten Aktionspotentiale. Auf diese Weise konnte das Areal bestimmt werden, in dem sich Hinterhornneurone befanden, die durch mechanische Stimulation des linken Kniegelenkes aktiviert wurden.

Auf dieses Areal wurde ein elliptischer Gummiring mit einem Ausmaß von ca. 3 x 5 mm und einer Füllkapazität von ca. 30  $\mu\text{l}$  mittels Silikongel aufgesetzt und abgedichtet und so vom restlichen Rückenmark abgegrenzt. Die übrige Oberfläche des Rückenmarks wurde mit 3%iger Agar-Tyrode-Lösung (Fluka, Deisenhofen) bedeckt zum Schutz vor Austrocknung und um die Expirationsbewegungen des Rückenmarks noch weiter einschränken zu können. Der Gummipool selbst wurde primär mit Tyrode gefüllt, um ein Austrocknen zu verhindern.

Die Versuchsanordnung war während des gesamten Versuchsablaufes auf einem schwingisolierten Tisch aufgebracht, um die Ergebnisse nicht durch Bodenvibrationen zu stören.

#### **3.4.2. Aufsuchen von Neuronen**

Mit einer glasisolierten Carbonfaserelektrode, eingespannt in den Mikrostepper, wurden Hinterhornneurone extrazellulär aufgesucht und anhand der Spikegröße und Höhe identifiziert. Bei jedem Versuchstier wurde nur ein geeignetes Neuron ausgewertet. Dabei wurden die folgend aufgeführten Auswahlkriterien zugrunde gelegt. Die aufgefundenen Neurone mussten auf mechanischen Druck auf das Kniegelenk antworten und sollten nur Afferenzen tiefer gelegener Gelenkstrukturen

wie Kapsel und Bandapparat führen. Die Antworten sollten nicht durch Streicheln oder Druck der Haut über dem Kniegelenk hervorgerufen werden. Ferner wurde darauf geachtet, dass die Aktivität weitgehend blieb von der Gelenkbewegung.

Konnten am Oszilloskop Aktionspotentiale gleicher Form und Höhe auf mechanischen Druck verifiziert werden, so galt dieses Hinterhornneuron zunächst als geeignet.

Um dessen Eignung zu prüfen, musste die Aktivität des Neurons auch über einen längeren Zeitraum, ca. eine halbe Stunde, auf mechanischen Druck stabil bleiben. Die Amplituden der Aktionspotentiale sollten dabei mindestens dreimal so hoch sein, wie die nahezu immer abzuleitende Hintergrundaktivität, die sich in Form und Höhe im Vergleich zu den bei uns ausgewählten Neuronen deutlich unterscheidet und herausgefiltert werden kann.

Neurone können aufgrund ihres Antwortverhaltens, ihrer Reizschwelle auf schmerzhaft und nicht schmerzhaft mechanische Reize und ihres rezeptiven Feldes in drei Gruppen eingeteilt werden (Neugebauer und Schaible 1990, Schaible et al 1991).

Dabei werden High-threshold (HT-) Neurone, die nur durch starke mechanische Reize aktiviert werden können, Low-threshold (LT-) Neurone, die am besten durch nicht schmerzhaft mechanische Stimulation aktiviert werden, und Wide-dynamic-range (WDR-) Neurone, die durch schwache mechanische Reize aktiviert werden können, aber die höchste Aktivität bei schmerzhaften Reizen zeigen, unterschieden. In unserem Experiment wurden nur Wide-dynamic-range Neurone beobachtet und ausgewertet.

Nach Auffinden eines Wide-dynamic-range Neurons wurde dessen rezeptives Feld genau bestimmt, welches sich in der Regel bereits zu Beginn des Versuches nach Protokoll 1, siehe 3.5.3., auf das linke Knie, das linke Sprunggelenk und die linke Pfote erstreckte. Aus diesem Grund erfolgte immer zusätzlich zur Stimulation des Kniegelenkes auch die des Sprunggelenkes und der Pfote, um Rückschlüsse auf eine spinale Beteiligung bei der Generierung der Übererregbarkeit führen zu können. Im Vergleich zum Protokoll 1 bestand bereits zu Beginn des Protokolls 2 eine Erweiterung des rezeptiven Feldes auf Sprunggelenk und Pfote, da primär bereits eine Entzündung gesetzt wurde und das Protokoll 2 mit einer spinalen Übererregbarkeit beginnt.

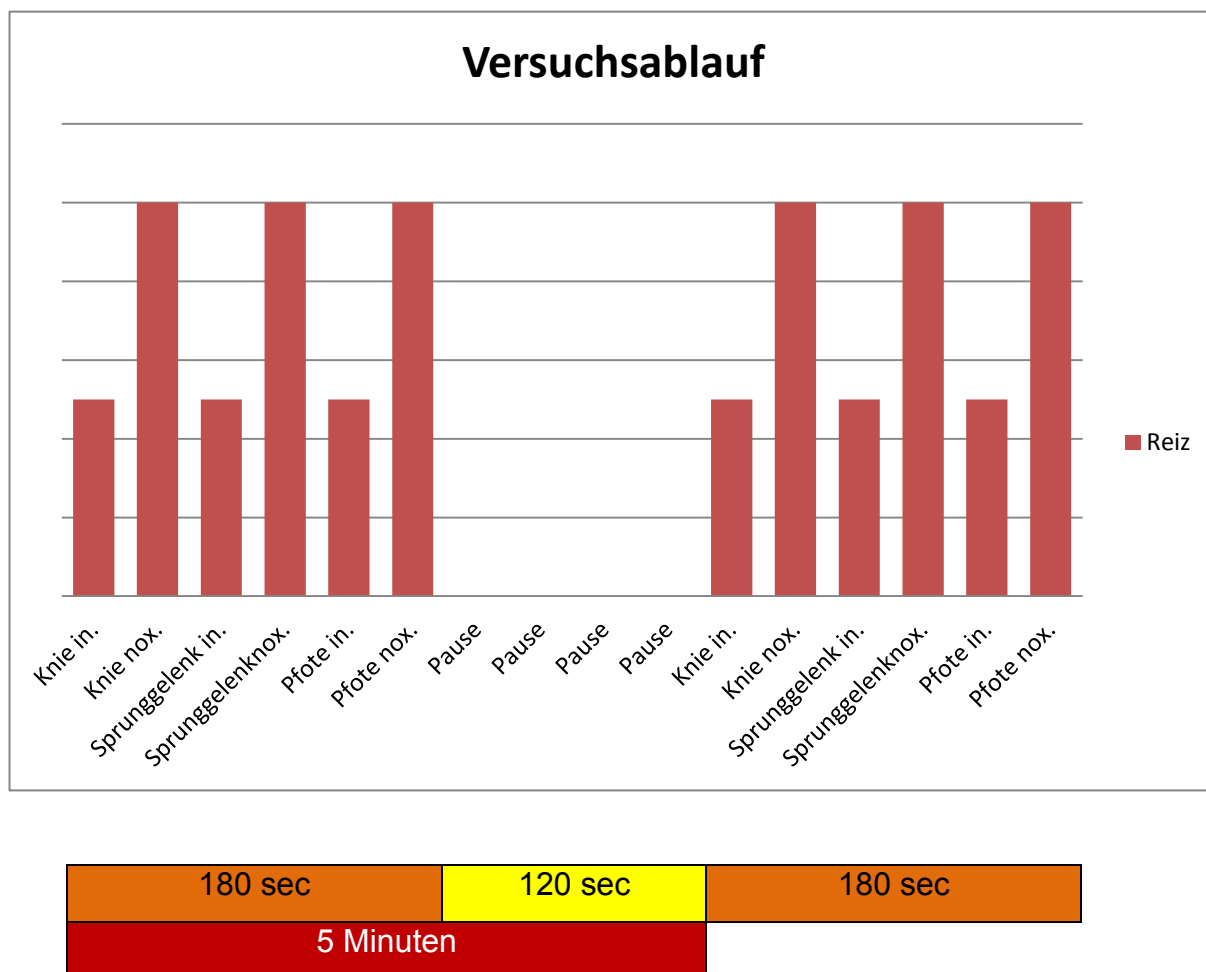
### 3.4.3. Versuchsprotokoll

Um den Einfluss eines spinal applizierten IKK-Inhibitors, in unserem Fall S1627, 1. bei der Generierung einer entzündungsbedingten spinalen Übererregbarkeit und 2. bei bereits bestehender entzündungsbedingter spinaler Übererregbarkeit zu klären, wurden zwei verschiedene Protokolle erstellt, die unten aufgeführt werden.

Beiden Versuchsprotokollen ist gleich, dass immer das linke Hinterbein der Versuchstiere zur Stimulation genutzt wurde.

Ferner wurde die Entzündung stets nach folgendem Schema induziert: In das linke Kniegelenk wurden zunächst 70 µl einer 4%igen Kaolin-Suspension (Sigma, Deisenhofen) injiziert und dieses dann langsam 15 Minuten bewegt. Anschließend wurden 70 µl einer 2%igen Carrageenan-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in das Kniegelenk injiziert und dieses für weitere 5 Minuten bewegt. Beim Versuchsprotokoll 1 erfolgt das Setzen der Entzündung während des Protokolls, beim Protokoll 2 direkt nach der Präparation vor Beginn der Neuronensuche. Zum Nachweis der Entzündung wurde bei allen Tieren zu Beginn des Experimentes und nach ca. 7-11 h bzw. nach Ende des Experimentes der Knieumfang des linken Kniegelenkes ermittelt.

Die Stimulation des aufgefundenen Neurons erfolgte jeweils zuerst nicht noxisch, dann noxisch für jeweils 15 Sekunden, angefangen am Kniegelenk, dann dem Sprunggelenk und zuletzt der Pfote mit jeweils gesetzten Pausen von 15 Sekunden. Dieser Stimulationszyklus wurde alle 5 Minuten wiederholt. Hierbei wurde jeder Block mit der noxischen Stimulation der Pfote nach 3 Minuten beendet und nach einer Pause von 2 Minuten der nächste Zyklus begonnen.



**Abbildung 3.1:** Versuchsablauf der Stimulationszyklen über 5 Minuten mit dreiminütiger Stimulation und zweiminütiger Pause, bevor der nächste Zyklus beginnt

Die Stimulation des Kniegelenkes erfolgte dabei in mediolateraler Achse durch eine mechanische Andrückvorrichtung (CORREX, Haag-Streit, Bern, Schweiz) mit einer nicht noxischen Intensität von  $1,9 \text{ N/40 mm}^2$  und einer noxischen Intensität von  $7,8$  oder  $5,9 \text{ N/40 mm}^2$ . Zur Stimulation von Sprunggelenk und Pfote wurden modifizierte Krokodilsklemmen verwendet mit einer nicht noxischen Intensität von  $1,1 \text{ N/20 mm}^2$  und einer noxischen Intensität von  $5,8 \text{ N/20 mm}^2$ . Auch bei den Versuchstieren, bei denen sich das rezeptive Feld nicht auf Sprunggelenk und Pfote oder nur auf das Sprunggelenk ausdehnte, wurden die Protokolle immer streng unter Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote durchgeführt, siehe Abbildung 3.2. Diese Neurone gingen für die nicht zu stimulierenden Lokalisationen nicht mit in die Auswertung ein,

weshalb die Neuronenanzahl  $n$  für die unterschiedlichen Reizlokalisationen unterschiedlich ausfällt.



**Abbildung 3.2:** Rezeptives Feld (von oben nach unten: Kniegelenk, Sprunggelenk, Pfote)

Bei der von uns verwendeten Substanz S1627 handelt es sich um einen kürzlich entwickelten IKK-Inhibitor, der im Labor aufbereitete IKK hemmt mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) von  $10 \pm 1,2$  nM, weshalb in diesem Experiment eine Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  gewählt wurde.

Ziel war hierbei, den Einfluss der Substanz auf die spinale Übererregbarkeit bei 1) im Verlauf gesetzter Entzündung und 2) bei bereits bestehender Entzündung/bzw. Übererregbarkeit zu untersuchen.

Zuerst untersuchten wir mit dem Versuchsprotokoll 1a) den Effekt von spinal appliziertem S1627 auf die sich entwickelnde entzündungsbedingte mechanische Übererregbarkeit bei acht Versuchstieren. Die ersten 30 Minuten wurden Knie-, Sprunggelenk und Pfote wie oben aufgeführt stimuliert, wobei sich auf dem abgegrenzten Rückenmarkareal lediglich eine Trägersubstanz, eine Tyrodelösung, befand. In Vorversuchen (Das Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone mit Einstrom vom Kniegelenk der Ratte unter selektiver Aktivierung der spinalen Prostaglandin E-Rezeptoren EP1-EP4, Dissertation, Philipp Teschner, FSU Jena,



2008) wurde bereits gezeigt, dass Tyrode keinen wesentlichen Einfluss auf das Antwortverhalten der Neurone hat. In dieser Versuchsreihe konnte ferner gezeigt werden, dass sich das Antwortverhalten der Neurone auch nach Langzeitreizung über einen Zeitraum von mehr als 150 Minuten nicht ändert. Außerdem zeigten diese Versuche unter Applikation von Tyrode keine Änderungen der Ausdehnung der rezeptiven Felder, so dass Tyrode in unseren Experimenten als Trägersubstanz genutzt wurde. Somit entstand für jedes Neuron zunächst eine Baseline, d.h. ein Ausgangslevel der neuronalen Aktivität, von dem ausgehend der Effekt unserer Substanz beurteilt und ausgewertet werden konnte. Zeigte sich innerhalb dieser Baseline, dass die Neuronenaktivität nicht konstant war, wurde das entsprechende Neuron verworfen und ein neues aufgesucht.

Anschließend wurde die Tyrodelösung durch S1627 ersetzt und die mechanisch induzierte Aktivität für weitere 30 Minuten nach oben aufgeführten Stimulationszyklus abgeleitet. Nachdem die lokale Entzündung im linken Kniegelenk gesetzt wurde, wie oben aufgeführt durch intraartikuläre Injektion einer 4%igen Kaolin-Suspension und einer 2%igen Carrageenan-Lösung, wurden die Zellantworten unter mechanischer Stimulation für weitere 4 Stunden registriert.

Bei sieben Versuchstieren wurde das gleiche Versuchsprotokoll als Neutralnull-Methode als Versuch 1b) angewendet, bei diesen Tieren wurde statt der Substanz S1627 nur ihr Vehikel DMSO spinal appliziert.

Im Anschluss daran untersuchten wir mittels Versuchsprotokoll 2) die Wirkung von S1627 bei bereits bestehender entzündungsbedingter mechanischer Übererregbarkeit bei sieben Versuchstieren. Hierbei wurde direkt nach der Präparation eine Entzündung ins linke Kniegelenk gesetzt und anschließend ein unseren Anforderungen entsprechendes Hinterhornneuron aufgesucht. Die Erfassung der neuronalen Aktivität erfolgte dann erst 7-11 Stunden nach Induktion der Entzündung, was der langen Suchzeit für ein geeignetes Neuron geschuldet war. Die ersten 60 Minuten nach Auffinden eines Neurons erfolgte die Stimulation unter spinal applizierten Vehikel DMSO als Baseline. Folgend wurde DMSO durch S1627 ersetzt und unter Stimulation die neuronalen Antworten für weitere 150 Minuten aufgezeichnet.

Auf die Neutralnull-Methode mit einer 150 Minuten Ableitung mit dem Vehikel DMSO wurde bei diesem Versuchsablauf verzichtet, da hierzu schon ausreichend Ergebnisse vorlagen und aus ethischen Gründen erneute Versuche diesbezüglich nicht gerechtfertigt waren. Es zeigte sich bei den Vorversuchen, dass unter dem Vehikel keine Änderung der neuronalen Aktivität zu verzeichnen war.

### **3.5. Auswertung**

Während die Online-Auswertung, die aus den in Echtzeit während des Experiments gezählten vom Digital-Oszilloskop aufgezeichneten Aktionspotentialen bestand, nur zur Kontrolle der folgend aufgeführten Offline-Auswertung diente, um mögliche technische Fehler auszuschließen, ging nur die Offline-Auswertung in die statistische Auswertung ein.

Nach der Aufzeichnung der Zellantworten während der Experimente konnten die Aktionspotentiale anschließend mit Hilfe des oben beschriebenen Software-Programms Spike-Spidi im Offline-Modus per Hand nach ihrer Form diskriminiert werden. Auf diese Art und Weise wurden Aktionspotentiale anderer benachbarter Neurone, sofern vorhanden, aussortiert, so dass nur die Antworten des beobachteten Neurons in die Auswertung einfließen.

Da bei den aufgefundenen Neuronen erhebliche Unterschiede bei der Anzahl der gemessenen Impulse bei den Baselines bestanden, wurden diese entsprechend auf Null gesetzt. Dies bedeutet, dass bei jedem Versuch der Mittelwert der während der Baseline aufgezeichneten Anzahl der Aktionspotentiale subtrahiert wurde von der im eigentlichen Experiment aufgezeichneten Anzahl der Impulse. Somit konnte verhindert werden, dass Zellen mit großer Impulsrate die Darstellung des Mittelwertes verfälschten. Damit erklären sich auch die Negativwerte für die Antwortrate nach Substanzapplikation bei abnehmendem Antwortverhalten.

Um die Wirkung von S1627 abschätzen zu können, wurde die Anzahl der Impulse während der Baseline von allen Versuchen anhand des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen (Rangtest für gepaarte Werte) verglichen mit dem Mittelwert der Impulse in Einstunden-Intervallen nach Applikation von S1627 oder dem Vehikel DMSO.

Ein signifikanter Unterschied zur Baseline wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen.

Im nachfolgenden Kapitel vier werden die Ergebnisse ausführlich dargestellt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Charakterisierung der spinalen Neurone**

#### **4.1.1. Klassifikation**

Bei 24 Versuchstieren wurden Neurone identifiziert. In die Bewertung eingeflossen sind nur 22 Versuchstiere mit jeweils einem Neuron. Sämtliche in die Auswertung eingeflossene Neurone waren Wide-dynamic-range-Neurone, die sowohl auf nicht noxische als auch auf noxische Stimulation antworteten.

Aus der Bewertung herausgenommen wurden 2 Versuchstiere, entsprechend 2 Neurone aus folgenden Gründen:

- 1 Tier, weil sich das rezeptive Feld nur auf das Knie beschränkte, adäquate Zellantworten bei Stimulation von Sprunggelenk und Pfote konnten nicht abgeleitet werden.
- 1 Tier, welches im Verlauf des Versuchsprotokolls verstarb.

#### **4.1.2. Lokalisation**

Die von uns abgeleiteten Neurone wurden im Hinterhorn in Tiefen von 330 – 1239 µm in den Segmenten L1-4 identifiziert.

#### **4.1.3. Rezeptive Felder**

Unter rezeptiven Feldern versteht man die peripheren Areale, von denen aus ein spinales Neuron aktiviert werden kann (Schaible H.-G. et al (2005)). Die rezeptiven Felder im Knie waren Voraussetzung für die Ableitungen der Aktionspotentiale der spinalen Neurone unserer Versuchsreihen. Die rezeptiven Felder der von uns ausgewerteten Neurone beinhalteten immer die Knie- und Sprunggelenke. Beim

Versuchsprotokoll 1a) beinhaltete das rezeptive Feld bei vier von acht Tieren bei noxischer Reizung und bei drei bei nicht noxischer Reizung die Pfote, bei 1b) bei sechs von sieben Tieren bei noxischer und nicht noxischer Reizung die Pfote und bei 2) bei fünf von sieben Tieren bei noxischer und nicht noxischer Stimulation die Pfote. Bei den Versuchstieren, bei denen das rezeptive Feld die Pfote nicht einschloss, erfolgte keine Neuronen-Ableitung bei Stimulation der Pfoten. Siehe dazu Tabelle 4.1.

Die Größe der rezeptiven Felder wurde zu Beginn des Versuchs bestimmt und im Versuchsprotokoll aufgezeichnet.

Versuch	Knie nox./nicht nox.	Sprunggelenk nox./nicht nox.	Pfote nox./nicht nox.
1a	8/8 (8)	8/8 (8)	4/3 (8)
1b	7/7 (7)	7/7 (7)	6/6 (7)
2	7/7 (7)	7/7 (7)	5/5 (7)
Gesamt	22/22 (22)	22/22 (22)	15/14 (22)

**Tabelle 4.1** Ausprägung der rezeptiven Felder bei insgesamt 22 Tieren nach Protokoll und anatomischen Gebieten sowie noxischer und nicht noxischer Stimulation. Hierbei wurde bei Versuch 1a der Effekt von spinal appliziertem S1627 auf eine sich entwickelnde entzündungsbedingte mechanische Übererregbarkeit bei acht Versuchstieren untersucht; bei Versuch 1 b handelt sich um eine Neutralnull-Methode zum Versuch 1a, wo bei demselben Versuchsablauf statt der Substanz nur ihr Träger DMSO spinal appliziert wurde, bei Versuch 2 wurde der Effekt von der Substanz S1627 bei bereits bestehender entzündungsbedingter spinaler Übererregbarkeit getestet.

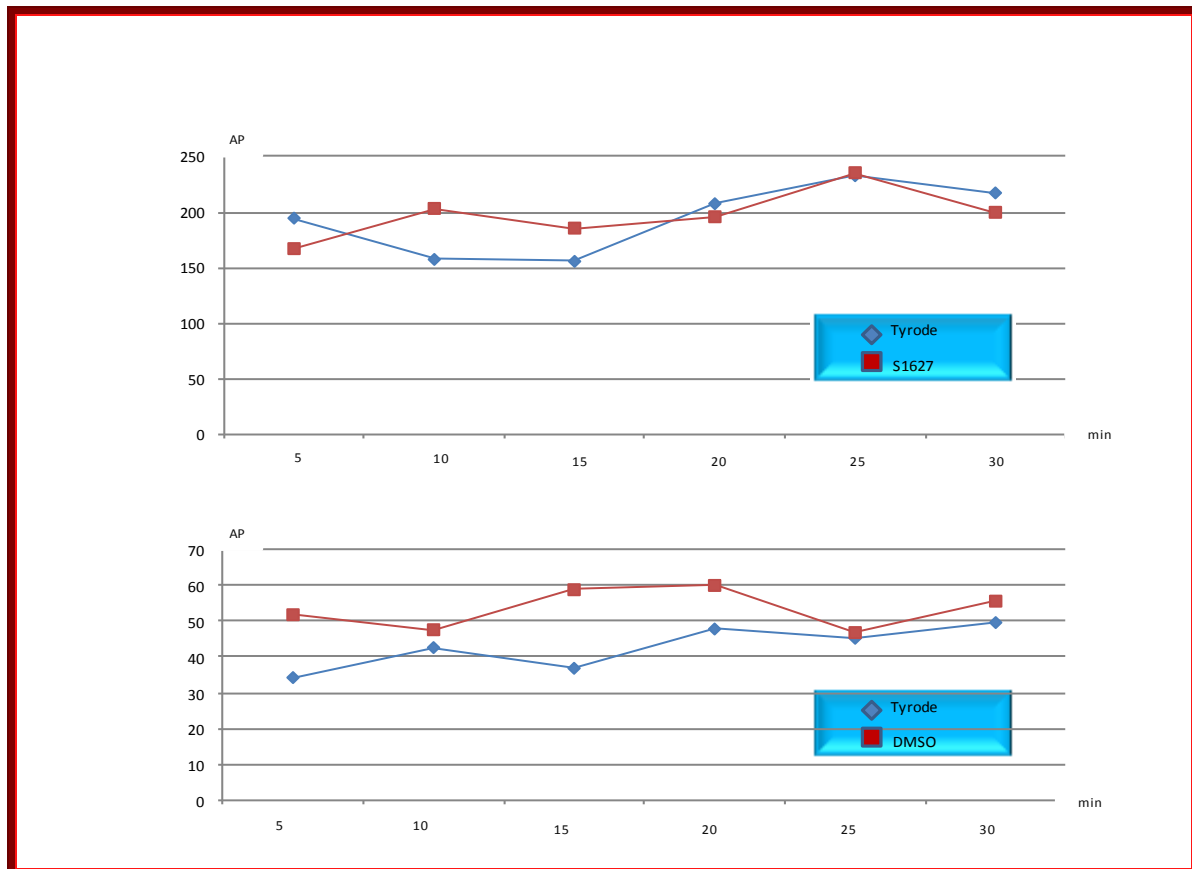
#### **4.2. Einfluss Trägersubstanzen und Testsubstanz auf die neuronale Aktivität**

Um vor Versuchsbeginn sicherzustellen, dass die Trägersubstanzen keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität haben, werden Kontrollexperimente durchgeführt. Dass die Applikation von Tyrode keinen Einfluss auf das Antwortverhalten von Neuronen hat und sich außerdem das Antwortverhalten eines Neurons auch bei Langzeitreizung mit Reizdauern von mehr als 150 Minuten nicht ändert, wurde bereits in vorausgegangenen Versuchsreihen gezeigt. Ausgehend von der Tatsache, dass Tyrodelösung keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität hat, wurde diese

Lösung in unserer Versuchsreihe als Trägerstoff gewählt. Zu Versuchsbeginn nach 30 minütiger Baseline mit einer Reizdauer von jeweils 30 Sekunden für nicht noxische und noxische Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote folgte nach Applikation von der durch uns zu testenden Substanz S1627 bzw. der Vehikel-/oder Kontrollsubstanz DMSO eine Ableitung von 30 Minuten unter wie vorgehend aufgeführter Stimulation von Knie, Sprunggelenk und Pfote. Dabei zeigte sich, dass es bei fehlender Entzündung im Kniegelenk weder unter der Substanz S1627 noch unter der Vehikelsubstanz DMSO zu einer relevanten Änderung des Antwortverhaltens der Neuronen kommt. Siehe hierzu Tabelle 4.2 und Graphik 4.b.

min			mAP (S1627)	mAP (DMSO)
1	Baseline (Tyrode)		194,5	34,2
6			157,25	42,6
11			155,5	36,8
16			207,5	47,8
21			232,75	45,2
26			217,25	49,6
31	Substanz		167	51,8
36			203,25	47,6
41			185,5	58,8
46			195,75	60
51			235,5	46,8
56			199,75	55,6

**Tabelle 4.2** Antwortverhalten von n=4 Neuronen für S1627 und n=5 Neuronen für DMSO bei nicht noxischer Reizung des Kniegelenkes unter Applikation von der Testsubstanz S1627 und unter Applikation von der Vehikelsubstanz DMSO jeweils für 30 Minuten und der dazugehörigen Baselines. Mittelwerte der Aktionspotentiale (mAP) in 5 Minuten-Intervallen nach Applikation nach Wilcoxon (Rangtest für gepaarte Werte).



**Graphik 4.a** Einfluss von Tyrode (= Baseline) im Vergleich zur Testsubstanz S1627 mit n=4 Tieren bzw. Vehikelsubstanz DMSO mit n=5 Tieren auf das neuronale Antwortverhalten; bei fehlender Entzündung resultiert keine relevante Änderung unter S1627 bzw. DMSO; Werte entsprechen den Mittelwerten der Aktionspotentiale bei nicht noxischer Stimulation der Kniegelenke über einen Zeitraum von 30 Minuten.

### 4.3. Einfluss einer Gelenkentzündung auf die neuronale Aktivität

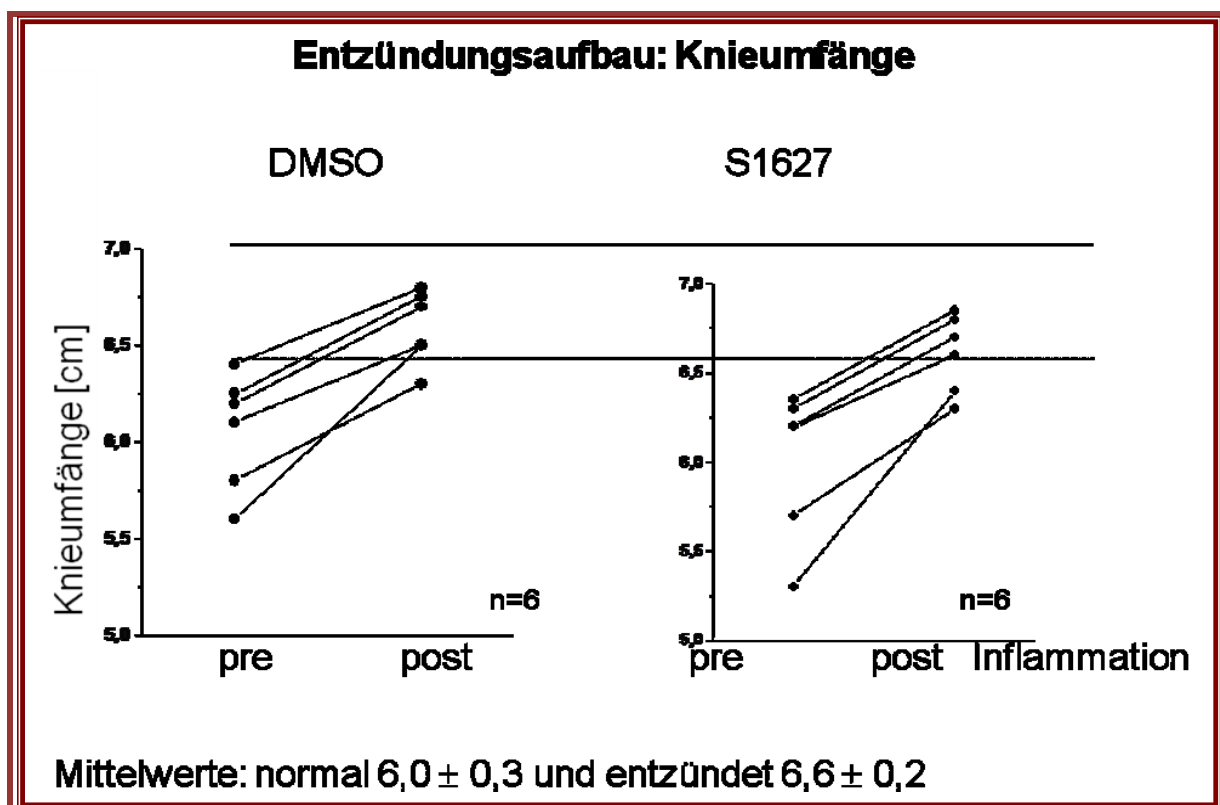
#### 4.3.1. Neuronale Aktivität bei im Verlauf induzierter Entzündung

Wie in Kapitel 4.2. aufgeführt, zeigt sich zunächst, dass vor Setzen der lokalen Entzündung nach der Baseline weder unter Applikation von dem Vehikel DMSO noch von der Testsubstanz S1627 eine wesentliche Änderung des Antwortverhaltens des Neurons auf mechanische Stimulation durch noxischen und nicht noxischen Druck auf Knie, Sprunggelenk und Pfote resultiert.

Eine Änderung im Antwortverhalten tritt erst im Verlauf nach Induktion der lokalen Entzündung im Knie auf. Während die Frequenz der Aktionspotentiale unter DMSO

deutlich zunimmt, bleibt sie unter der Testsubstanz S 1627 relativ konstant, wie unter 4.3.1.1 und 4.3.1.2. aufgeführt.

In beiden Gruppen nimmt als Zeichen der lokalen Entzündung der Knieumfang nach Injektion von Kaolin und Carrageenan gleichermaßen zu. In der S1627-Gruppe wächst er von  $6,0 \pm 0,4$  cm auf  $6,6 \pm 0,2$  cm, in der Vehikel-Gruppe von  $6,1 \pm 0,3$  cm auf  $6,6 \pm 0,2$  cm. Siehe Graphik 4.c.



**Graphik 4.b** Knieumfänge vor und nach Setzen einer Entzündung im Kniegelenk, Umfangszunahme bei allen Tieren als Zeichen einer lokalen Entzündung, gemessen wurden die Kniegelenkumfänge mehrere Stunden nach Setzen der Entzündung am Ende jedes Versuches

#### 4.3.1.1. Effekt eines Vehikels auf die Aktivität

Nach Induktion der lokalen Entzündung im Kniegelenk entwickelte sich unter DMSO eine signifikante spinale Übererregbarkeit im Gegensatz zur Versuchsreihe unter der Testsubstanz S1627. Diese manifestierte sich in einer Zunahme der neuronalen Zellantworten, sowohl auf mechanische Stimulation des entzündeten Kniegelenkes

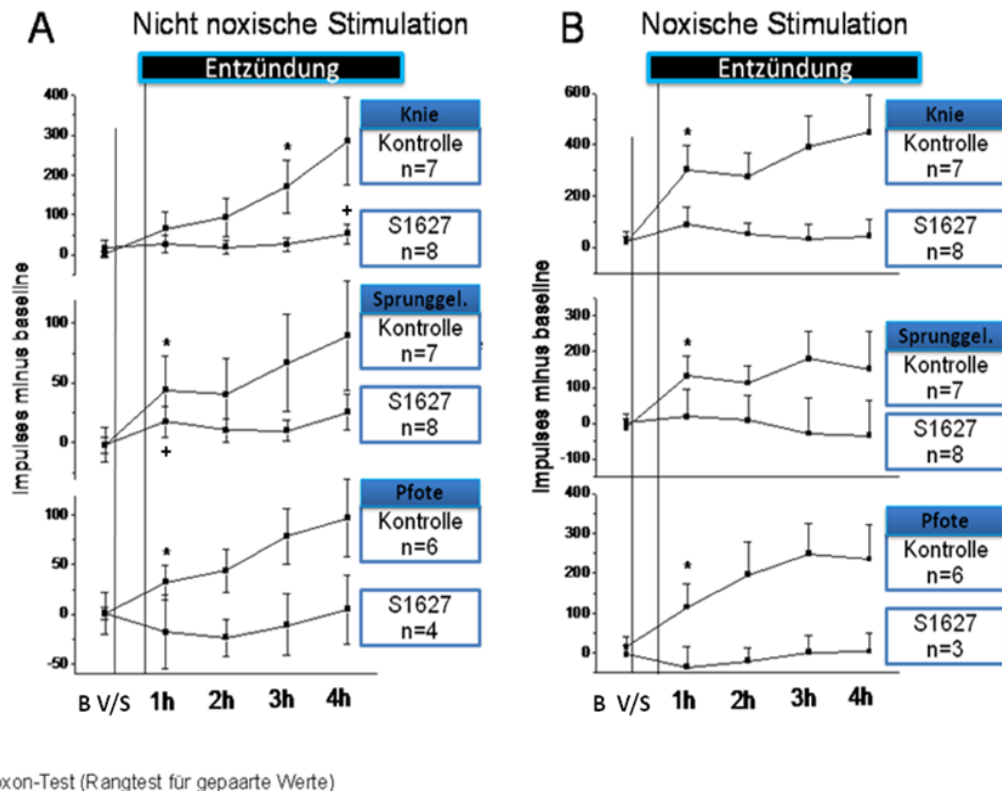


als auch, als Zeichen der zentralen Übererregbarkeit, auf mechanische Stimulation des lokal nicht entzündeten Sprunggelenkes und der Pfote. Siehe dazu Graphik 4.c. Die in dieser Graphik dargestellten Werte sind die Mittelwerte der Baseline unter Tyrode-Lösung, dann nach Applikation des Vehikels DMSO oder der Substanz S1627 (V/S) und zuletzt die Mittelwerte eines vierstündigen Intervalls nach Injektion von Kaolin und Carrageenan. Die Graphik 4.c verdeutlicht die Zellantworten auf A nicht noxische und B noxische mechanische Stimulation am Knie- und Sprunggelenk und der Pfote im Vergleich unter der Substanz S1627 und dem Vehikel DMSO während einer sich ausbildenden Entzündung im Kniegelenk. Die Graphik resultiert aus den oben aufgeführten Mittelwerten der Zellantworten zunächst unter der Tyrode-Lösung, entspricht Baseline B, und nach 30 Minuten unter der Substanz S1627 bzw. dem Vehikel DMSO (S/V) und zum Schluss dem Intervall von ca. vier Stunden nach Induktion der lokalen Entzündung im Kniegelenk. Mit Sternchen sind in der Graphik 4.c die unter dem Vehikel, mit einem Kreuz die unter S1627 ausgewerteten ersten Werte markiert, die sich signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  von der Baseline unterscheiden.

#### **4.3.1.2. Effekt des IKK-Inhibitors S1627 auf die Aktivität**

Nach Setzen der lokalen Entzündung im Kniegelenk durch Injektion von Kaolin und Carrageenan unter dem IKK-Inhibitor S1627 konnte weder unter noxischer noch nicht noxischer mechanischer Stimulation eine signifikante spinale Übererregbarkeit nachgewiesen werden im Verlauf von ca. vier Stunden. Siehe dazu die Graphik 4.c.

## Entzündungsaufbau: S1627 versus Kontrolle



**Graphik 4.c** Effekt von spinal applizierter Substanz S1627 auf die Ausbildung einer entzündungsbedingten Übererregbarkeit im Vergleich zum Vehikel DMSO als Kontrolle. Dargestellt sind Änderungen im Antwortverhalten auf A nicht noxischen und B noxischen Druck auf Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote. Die Reduktion der Anzahl der ausgewerteten Pfoten im Vergleich zur Anzahl von Knie und Sprunggelenk erklärt sich durch die fehlende Ausdehnung des rezeptiven Feldes auf die Pfote, so dass keine Messdaten erhoben werden konnten. Mit Sternchen sind in der Graphik 4.c die unter dem Vehikel, mit einem Kreuz die unter S1627 ausgewerteten ersten Werte markiert, die sich signifikant bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  von der Baseline unterscheiden.

### 4.3.2. Neuronale Aktivität bei bestehender Entzündung

Bei dieser Versuchsreihe wurde die lokale Entzündung bereits zu Beginn des Experiments induziert. Als Nachweis der lokalen Entzündung wurden auch hier die Knieumfänge bestimmt. Diese waren zunehmend von  $5,4 \pm 0,21 \text{ cm}$  auf  $6,2 \pm 0,26 \text{ cm}$ . Anschließend wurden die unseren Bedingungen entsprechenden Hinterhorn-Neurone mittels Glasfaserelektrode identifiziert und die neuronale Aktivität in Form

von Aktionspotentialen abgeleitet. Die Ableitungen erfolgten bei unseren sieben Versuchstieren ca. 7-11 Stunden nach Entzündungsinduktion. Nach einer Baseline von 60 Minuten unter Tyrode wurde die Testsubstanz S1627 auf das Rückenmark appliziert und für weitere 150 Minuten abgeleitet. Die Aktionspotentiale der 60 minütigen Baseline wurden auf Null gesetzt, indem sie von den nach Applikation der Substanz S1627 abgeleiteten Aktionspotentiale subtrahiert wurden, um eine absolute Änderung im Antwortverhalten sichtbar zu machen.

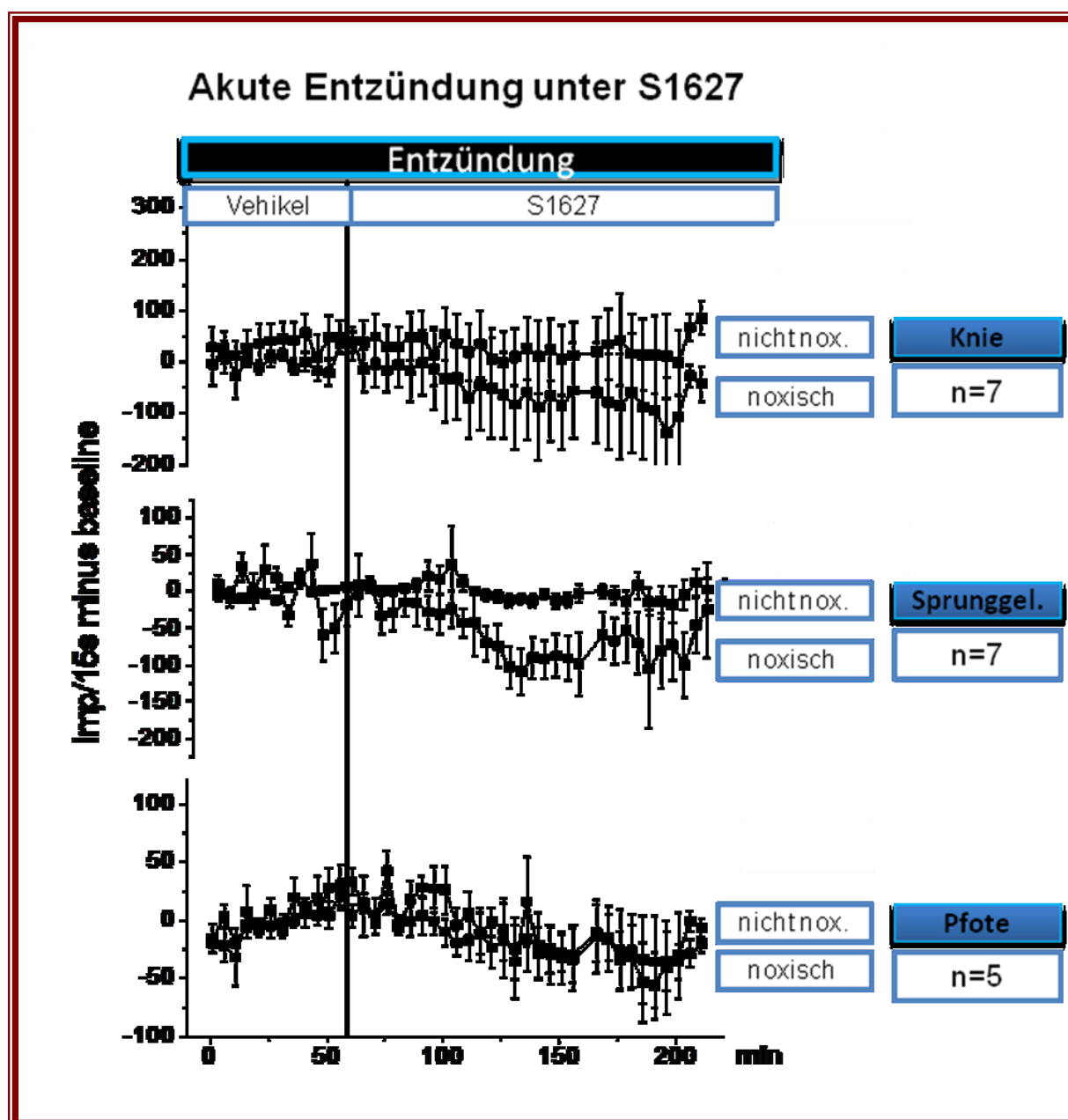
#### **4.3.2.1. Effekt des Vehikels DMSO auf die Aktivität**

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Applikation von DMSO bei bestehender entzündungsbedingter Übererregbarkeit keine Änderung im Antwortverhalten hervorruft, weder im Sinne einer ansteigenden noch rückläufigen Frequenz der abgeleiteten Aktionspotentiale.

Aus ethischen Gründen wurden diese Versuche in unserem Experiment nicht wiederholt und es wird auf bestehendes Datenmaterial unseres Labors verwiesen.

#### **4.3.2.2. Effekt des IKK-Inhibitors S1627 auf die Aktivität**

Es zeigte sich, dass unter dem festgelegten Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (Wilcoxon-Test für gepaarte Werte) die spinale Applikation von der Testsubstanz S1627 zu keiner signifikanten Änderung im Antwortverhalten führte über die gesamte Reizdauer von 2 ½ Stunden nach Applikation, weder auf nicht noxische noch noxische Stimulation des entzündeten Kniegelenkes. Die Antwortrate auf noxische Stimulation des nicht entzündeten Sprunggelenkes zeigte nur vorübergehend eine rückläufige Tendenz. Siehe dazu Graphik 4d.



**Graphik 4.d** Effekt von spinal applizierter Substanz S1627 auf das neuronale Antwortverhalten unter bestehender lokaler Entzündung und damit auf die entzündungsbedingte Übererregbarkeit. Dargestellt sind Antwortveränderungen auf nicht noxischen und noxischen Druck auf Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote, Mittelwerte

Die Reduktion der Anzahl der ausgewerteten Pfoten im Vergleich zur Anzahl von Knie und Sprunggelenk erklärt sich durch die fehlende Ausdehnung des rezeptiven Feldes auf die Pfote, somit konnten keine Messdaten erhoben werden.

#### **4.4. Zusammenfassung der Versuchsergebnisse:**

In dieser Arbeit wurde der Effekt von der von der Firma Aventis entwickelten Substanz S1627 im Vergleich zur Kontrolle mit dem Vehikel DMSO untersucht. Dabei wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Es wurde 1. der Effekt des Vehikels und 2. der Substanz S1627 im Sinne eines Prophylaktikum bei nach Applikation induzierter Entzündung und 3. der Substanz S1627 im Sinne eines Therapeutikum bei vor Applikation generierter Entzündung getestet. Dabei wurden folgende Effekte beobachtet:

1. Weder die Testsubstanz noch die Vehikelsubstanz führten bei fehlender Entzündung zu einer signifikanten Änderung des neuronalen Antwortverhaltens (vgl. 4.2).
2. Die spinale Applikation der Vehikelsubstanz DMSO verhinderte bei Langzeitapplikation nicht die steigende entzündungsbedingte spinale Übererregbarkeit bei sich im Verlauf generierender lokaler Entzündung im linken Kniegelenk. Die Entladungsrate der untersuchten Neurone auf mechanische Stimulation stieg nach Induktion der lokalen Entzündung deutlich an (vgl. Kapitel 4.3.1.1).
3. Die spinale Applikation der Testsubstanz S1627 verhinderte bei Langzeitapplikation die Entwicklung einer entzündungsbedingten spinalen Übererregbarkeit bei im Verlauf induzierter lokaler Entzündung im linken Kniegelenk (vgl. Kapitel 4.3.1.2).
4. Die spinale Applikation der Testsubstanz S1627 hat im Durchschnitt keinen signifikanten Einfluss auf das Antwortverhalten auf mechanische Stimulation bei bestehender entzündungsbedingter spinaler Übererregbarkeit (vgl. Kapitel 4.3.2.2).
5. Bei jeder Versuchsreihe nahm der Umfang des Kniegelenkes als Zeichen einer lokalen Entzündung signifikant zu (vgl. Kapitel 4.3.1). Die Umfangszunahme wurde durch S1627 offensichtlich nicht beeinträchtigt.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Kritische Betrachtung der Methodik**

#### **5.1.1 Tiermodell**

Das in unserer Arbeit verwendete Tiermodell ist ein geeignetes zur Prüfung einer spinal applizierten Substanz, da die Versuchsbedingungen sowohl für die Substanz- als auch die Kontrollgruppen konstant gehalten werden können. Damit sind die Resultate vergleichbar und reproduzierbar.

Die Wirkung bei unserem Versuchsmodell ist gut nachvollziehbar, da es sich um eine rein neuronale Reaktion handelt, die unabhängig ist von der Kognition des Versuchstieres.

Tierversuche liefern generell nur Informationen über die Wirksamkeit der getesteten Substanz, haben aber keinen Einfluss auf die kognitive und affektive Komponente des menschlichen Schmerzes.

Der Nachteil elektrophysiologischer Untersuchungen besteht darin, dass zwar Informationen über Veränderungen der Aktivität nozizeptiver Neurone gewonnen werden, dafür aber oft keine Nebenwirkungen ermittelt werden.

#### **5.1.2 Versuchsvorbereitung**

Potentielle Fehlerquellen unserer Versuchsreihe sind bereits in der Versuchsvorbereitung während der Präparation und der gesamten Narkosephase zu suchen. Die chirurgische Präparation erfolgt rückenmarknah, wenngleich unter sorgfältiger Schonung des Rückenmarks und der begleitenden benachbarten Strukturen. In der Ableitung der Hinterhornneuronenantworten auf mechanische Stimulation vor Ausbildung einer peripheren Entzündung zeigten sich hier keine deutlichen Auffälligkeiten im Antwortverhalten im Sinne einer gesteigerten Antwortfrequenz als Zeichen einer potentiellen zentralen Sensibilisierung als Folge einer Schädigung des Rückenmarks durch die Präparation. Da der

Präparationsablauf bei allen Versuchstieren gleich war, ist hierdurch keine Beeinflussung der Ergebnisse zu erwarten.

Auch die von Hartell und Headley nachgewiesene Einflussnahme von der Allgemeinanästhesie auf das neuronale Antwortverhalten (Hartell et Headley (1990)) sollte als potentielle Fehlerquelle genannt werden. Soweit möglich, wurde die Narkosetiefe anhand des Blutdrucks während der Versuche kontrolliert und bei steigendem Blutdruck, was als Hinweis für das Nachlassen der Narkose gewertet wurde, entsprechend Thiopental nachappliziert. Auch bei der Narkose gilt, dass die Fehlerquelle hier zu vernachlässigen ist, da die Versuchstiere sämtlich gleich behandelt wurden.

### **5.1.3 Stimulation**

Kniegelenk, Sprunggelenk und Pfote wurden unter standardisierten Bedingungen mechanisch unter zu Hilfenahme von geeichten Vorrichtungen stimuliert. Die mechanische Reizung des Kniegelenkes erfolgte hierbei mit Stempeln für die nicht noxische Reizung mit einem Kompressionsdruck von  $1,9\text{N}/40\text{mm}^2$  und die noxische Reizung mit  $7,8\text{N}/40\text{mm}^2$ . Bei Sprunggelenk und Pfote kamen Krokodilsklemmen zum Einsatz mit einem Kompressionsdruck von nicht noxisch  $1,1\text{N}/20\text{mm}^2$  und noxisch  $5,8\text{N}/20\text{mm}^2$ . Die potentielle Fehlerquelle bestand hierbei, den Druckpunkt zu verändern und so Veränderungen im neuronalen Antwortverhalten auszulösen. Bei generierter peripherer Entzündung gestaltete es sich zunehmend schwieriger, den Gelenkspalt als Druckpunkt auszumachen durch die Ödem- und Ergussbildung. Da sich andererseits das rezeptive Feld bei bestehender Entzündung ausdehnte, relativierte sich die Notwendigkeit der Zielgenauigkeit, so dass geringe Druckpunktveränderungen höchstens geringe Veränderungen im Antwortverhalten zur Folge hatten.

#### **5.1.4 Aufsuchen und Ableitung der Hinterhornneuronen**

Die Schwierigkeit der von uns angewandten Methode der extrazellulären Ableitung mittels Carbonfaserelektroden bestand darin, geeignete Hinterhornneuronen zu finden, die auf mechanische Stimulation im Kniegelenk reagierten, die entsprechend wesentlich an der Nozizeption bei Arthritiden beteiligt sind, und diese auch über Stunden zu halten. Das Auffinden eines Neurons dauerte mitunter Stunden. Wurde eines als geeignet bewertet, wurde genau geprüft, ob es den Auswahlkriterien entsprach. Es sollte hauptsächlich auf mechanischen noxischen Druck auf das Kniegelenk antworten. Neurone, die bereits auf geringe Berührung der Haut reagierten, wurden ausgeschlossen. Auch die reine Bewegung sollte zu keiner Aktivitätssteigerung des Neurons führen. Man nennt Neurone, die hauptsächlich durch nozizeptive mechanische Reize stimuliert werden, WDR (wide dynamic range)-Neurone. Mittels Oszilloskop wurden die abgeleiteten Aktionspotentiale bezüglich ihrer Höhe und Form beurteilt und auf ihre Eignung untersucht. Ein geeignetes Neuron sollte im Verlauf über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten stabil abgeleitet werden. War dies nicht der Fall, wurde es verworfen und ein neues Neuron aufgesucht.

Eine andere Gefahr bestand darin, ein bereits gefundenes Neuron zu verlieren. Dies war möglich durch minimale Verschiebungen des Rückenmarks z.B. bei Manipulationen am Tier beim Anbringen einer wärmenden Isolierung bei beginnender Hypothermie, bei spinaler Applikation der Substanzen und auch bei leichten Stößen an den schwingisolierten Tisch. Auch die Atmung, die bei nachlassender Narkosewirkung verstärkt war, konnte dazu führen, dass sich durch kleinste Verschiebungen des Neurons zur ableitenden Elektrode Änderungen in Bezug auf Form und Größe der Aktionspotentiale ergaben. Diesbezüglich wurde sehr genau darauf geachtet, ob sich zum Beispiel Blutdruckanstiege oder Veränderungen der Atmung zeigten, die auf ein Nachlassen der Narkose deuten könnten.



## **5.2 Wirkung der Testsubstanz auf die spinale Übererregbarkeit**

Da die Phosphorylierung von I $\kappa$ B durch die I $\kappa$ B-Kinase (IKK) den ersten Schritt ausmacht bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B bei entzündungsbedingten Erkrankungen mit nachfolgender Genexpression, ist bei Hemmung der IKK zu erwarten, dass eine Abnahme infektions- oder stressbedingter Hochregulierung proinflammatorischer Gene eintritt und damit die Entzündung mit ihren begleitenden Symptomen gehemmt wird. Ziel unserer Arbeit war es, den Einfluss eines spinal applizierten IKK-Hemmers sowohl auf die bestehende neuronale Übererregbarkeit bei generierter peripherer Entzündung als auch auf die sich potentiell ausbildende Übererregbarkeit bei sich generierender peripherer Entzündung zu testen.

Wir stellten auffällige Unterschiede bei der prophylaktischen und der therapeutischen Gabe des IKK-Inhibitors S1627 fest.

### **5.2.1 Effekt der Testsubstanz vor Generierung einer peripheren Entzündung**

Unsere Daten zeigen, dass es unter spinaler Applikation des IKK-Hemmers S1627 vor Generierung einer peripheren Entzündung im Kniegelenk zu keiner Änderung im Antwortverhalten im Sinne eines Anstiegs der Aktionspotentialfrequenz spinaler Neurone kommt bei einem Ableitzeitraum von vier Stunden. Die Ausbildung einer Übererregbarkeit von den untersuchten Hinterhornneuronen, die für gewöhnlich durch eine akute Kniegelenkentzündung aktiviert werden, blieb sowohl bei noxischer als auch nicht noxischer Stimulation aus. Es kam wiederum aber auch zu keiner Abnahme der neuronalen Antworten. Dabei zeigte sich bei jedem Versuch als Beweis einer generierten Arthritis eine Zunahme des Kniegelenkumfanges. Daraus schlossen wir, dass die Aktivierung von spinalem NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Nozizeption und bei der zentralen Sensibilisierung bei Generierung einer peripheren Entzündung einnimmt.

Auch Lee et al vermuteten, dass sowohl die Hochregulation der COX-2 als auch die nachgewiesene Schmerzüberempfindlichkeit bei peripherer Entzündung durch die Aktivierung NF- $\kappa$ B-abhängiger Prozesse verursacht wird (Lee et al (2004)).

### 5.2.2 Effekt der Testsubstanz bei bestehender peripherer Entzündung

Bei unseren Versuchstieren mit entzündeten Kniegelenken und voll ausgebildeter spinaler Übererregbarkeit zeigte sich ein erweitertes rezeptives Feld mit gesteigertem Antwortverhalten auch in den dem entzündeten Kniegelenk angrenzenden nicht entzündeten Gebieten, wie Sprunggelenk und Pfote. Die spinale Applikation von der Testsubstanz S1627 führte bei Stimulation des entzündeten Kniegelenkes über einen Zeitraum von 2,5 Stunden zu keiner signifikanten Abnahme der spinalen Antworten in Form von Aktionspotentialen. Die Übererregbarkeit blieb unverändert bestehen. Dass die spinale Übererregbarkeit in unserem Modell generell jedoch beeinflussbar ist, zeigten Vorversuche, bei denen die Antwortfrequenz, gemessen in Aktionspotentialen, bei dem gleichen Modell mit entzündetem Kniegelenk gesenkt werden konnte durch non-NMDA-/ NMDA-/ CGRP- und andere Rezeptorantagonisten (Schaible H.-G. (2005)).

Daraus schlossen wir, dass die Aufrechterhaltung spinaler Übererregbarkeit nicht von einer fortlaufenden Aktivierung von spinalem NF- $\kappa$ B abhängt.

Ein wichtiger Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist die Aktivierung der Prostaglandinsynthese. Prostaglandine sind lokale Mediatoren und werden sowohl von primär afferenten Neuronen als auch von Rückenmarkneuronen produziert. Tatsächlich verhindern NF- $\kappa$ B-Inhibitoren das Hochregulieren spinaler NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), die wiederum u.a. für die Prostaglandinsynthese relevant sind. Tegeder et al konnten anhand ihrer Versuche nachweisen, dass der IKK-Inhibitor S1627 in einer IKK-haltigen Probe deren Aktivität senkt und in Zellkultur-Experimenten die Interleukin-1 $\beta$ -stimulierte nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B und dessen Bindung an die DNA hemmt und so die Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene gehemmt wird. Anhand von Tiermodellen zeigten sie, dass es unter intraperitonealer Injektion von S1627 zu einer Abnahme der thermischen und mechanischen Hyperalgesie und des lokalen Ödems in der getesteten entzündeten Tiermodellpfote kommt. Bei Tegeder et al war der antihyperalgetische Effekt unter dem IKK-Hemmer sogar größer als der unter nichtsteroidalen Antiphlogistika. Im Gegensatz zu unserem Versuchsmodell, bei dem die Applikation der Substanz S1627 spinal erfolgte und nach Ausbildung der Entzündung mit der damit verbundenen spinalen

Übererregbarkeit keine signifikante Beeinflussung nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei Tegeder et al unter intraperitonealer Gabe von S1627 nach Ausbildung der spinalen Übererregbarkeit ein antinozizeptiver Effekt. Aus diesem Grund schlossen Tegeder et al, dass irrelevant ist, an welchem Punkt des neuropathischen Entzündungsprozesses die NF- $\kappa$ B-stimulierte Gentranskription blockiert wird. Es wurde auch nachgewiesen, dass erst eine dreifache Dosis der intraperitoneal applizierten Substanz (3 x 30mg/kg Körpergewicht) zu einer vollständigen Rückbildung der induzierten Hyperalgesie führte und diese Dosis die NF- $\kappa$ B-stimulierte Hochregulation von COX-2, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hemmte. Die Schlussfolgerung, die sich hieraus ergab, war, dass für eine vollständige antinozizeptive Wirksamkeit die spinalen Effekte notwendig sind und hierfür bestimmte Dosen der Substanz zentral vorliegen müssen. Ferner stellten sie fest, dass die Substanz keinen akuten Effekt auf die entzündungsbedingte Nozizeption hat, da eine Latenz vorlag nach Injektion der ersten Dosis und dem Auftreten der Antinozizeption, weshalb davon auszugehen ist, dass die antinozizeptive Wirkung durch die Hemmung der bereits vorliegenden stimulierten Gentranskription vermittelt wird (Tegeder et al (2004)).

Ein weiterer Punkt, der für die Aktivierung der Prostaglandinsynthese durch die NF- $\kappa$ B-Kaskade spricht, ist die Tatsache, dass sich der Effekt von spinal appliziertem S1627 bei durch eine periphere Entzündung indizierter spinaler Übererregbarkeit nahezu nicht unterscheidet von dem durch spinal appliziertes Indomethazin, einem Prostaglandinsynthesehemmer. Auch hier zeigte sich korrelierend zum Effekt von S1627 bei bereits generierter lokaler Entzündung und spinaler Applikation von Indomethazin keine Abnahme der spinalen Übererregbarkeit. Lediglich die systemische Gabe führte zur Reduktion. Hieraus kann geschlossen werden, dass die spinale Prostaglandinsynthese zwar relevant ist für die Generierung aber nicht für die Aufrechterhaltung spinaler Übererregbarkeit (Vasquez et al (2001)). Allerdings führt die spinale Applikation von Indomethazin hierbei zu einer Abnahme der Prostaglandin E2-Freisetzung im Rückenmark ähnlich den selektiven COX-2-Inhibitoren (Telleria-Diaz et al (2006)). Spinal appliziertes Indomethazin verhinderte vor und während der Ausbildung einer peripheren Entzündung in anderen Versuchsmodellen die Entstehung einer entzündungsbedingten Übererregbarkeit, was sich wiederum vereinbar zeigt mit der wesentlichen Funktion spinaler

Prostaglandine bei der Ausbildung der zentralen Sensibilisierung. Die spinale Applikation von Prostaglandinen wiederum führte zur Steigerung im Antwortverhalten und zur Ausdehnung des rezeptiven Feldes der betroffenen Hinterhornneurone (Vasquez et al (2001)).

Entzündungsschmerz wird bis dato hauptsächlich mittels nichtsteroidaler Antiphlogistika (NSAID/NSAR) behandelt, in der Regel nicht selektiven COX-Inhibitoren. Sie beeinflussen im Sinne einer Reduktion sowohl die Entzündung als auch die Schmerzüberempfindlichkeit über ihre Wirkung an den peripheren Nozizeptorendigungen. Das im Körper ubiquitär vorkommende Enzym Cyclooxygenase (COX) vermittelt die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine, die letztendlich durch weitere Prozesse unter anderem zu den relevanten Prostanoiden PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> modifiziert werden. Sie sind dabei sowohl bei pathologischen Prozessen wie Entzündungen als auch physiologischen Prozessen wie Nieren-/ oder Magenschutz beteiligt. Die Halbwertszeiten betragen nur Sekunden bis Minuten. Hierbei wird die COX-1 in nahezu allen Organen exprimiert und dient hauptsächlich physiologischen Prozessen in Magen, Niere, Lunge, Milz und Gefäßendothel (Tegeder et al (2000)). Die COX-2 dient in geringen Ausmaßen auch physiologischen Prozessen wie der Wundheilung und Nierendurchblutung, ist andererseits wesentlich beteiligt bei entzündlichen Prozessen. Es kommt dabei nicht nur bei akuten Entzündungen, sondern auch bei chronischen Entzündungen, zu denen die rheumatoide Arthritis gezählt wird, zur vermehrten Expression von COX-2 (Anderson et al (1996)). Nachfolgend kommt es lokal zur vermehrten Prostaglandinproduktion, die lokal zu den Kardinalsymptomen der Entzündung führt mit Rötung, Schwellung, Überwärmung und Schmerzen durch Sensibilisierung der nozizeptiven Afferenzen.

Zahlreiche Studien belegen, dass besonders die Prostaglandine PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> zur peripheren Sensibilisierung nozizeptiver Afferenzen für mechanische, chemische und thermische Reize führen durch Absenken der Erregungsschwelle und Steigerung der neuronalen Entladungsrate (Handwerker, H.O. (1976), Schaible et Schmidt (1988 I/II)). Auch bei der zentralen Sensibilisierung spielen Prostaglandine eine wesentliche Rolle (Vanegas et Schaible (2001)). Eine hohe spinale Prostaglandinausschüttung, vorzugsweise PGE<sub>2</sub>, konnte nachgewiesen werden nach Induktion einer peripheren Entzündung (Ebersberger et al. (1999)). Es ist bekannt, dass sowohl akute, als auch

chronische periphere Entzündungen neben Interleukinen und Verletzungen des Rückenmarks zu einer vermehrten spinalen PG-Freisetzung führen. Diese führen zur Senkung der Erregungsschwelle und zum Ansteigen der neuronalen Entladungsrate. Spinal appliziertes PGE<sub>2</sub> führte ebenfalls zum Anstieg im Antwortverhalten nozizeptiver Hinterhornneurone auf noxische und nicht noxische Reizung im peripheren Gelenk im Sinne einer Hyperalgesie und Allodynie, vergleichbar mit einer peripheren Entzündung (Vasquez et al (2001)). Die Ursache dafür liegt darin, dass bei einer peripheren Entzündung die COX-2 verstärkt im Rückenmark exprimiert wird. Ein Beispiel hierfür ist die durch intraartikuläre Injektion von Carrageenan und Kaolin ins Kniegelenk von Ratten verursachte Arthritis, die auch in unserer Versuchsreihe Anwendung fand, mit nachfolgender vermehrter Expression von COX-2 (Ebersberger et al. (1999)).

Es wurde ferner nachgewiesen, dass die COX-2 nicht nur peripher, sondern auch in Neuronen des ZNS induziert wird bei peripherer Entzündung, was neben der peripheren Sensibilisierung durch lokale COX-2-Induktion in Immunzellen auch eine zentrale Sensibilisierung durch zentrale COX-2-Induktion in Hinterhornneuronen hervorruft durch Steigerung der neuronalen Erregbarkeit. Vardeh et al schlossen aus den Ergebnissen ihrer Versuche, dass die Induktion der COX-2 in Neuronen des ZNS zum entzündungsbedingten Schmerz führt, z.B. postoperativ und auch bei Arthritiden. Sie stellten fest, dass die neuronale COX-2 die mechanische Überempfindlichkeit bei entzündungsbedingtem Schmerz zu beeinflussen scheint, während die thermische Überempfindlichkeit durch die periphere COX-2-Induktion bedingt zu sein scheint (Vardeh et al (2009), Lee et al (2004)). Hierdurch ergeben sich unterschiedliche Indikationen für Analgetika. Während zum Beispiel bei Sonnenbrand die thermische Überempfindlichkeit im Vordergrund steht und damit die periphere COX-2-Induktion gehemmt werden muss, bedarf es bei peripheren Entzündungen, wie Arthritiden, mit vor allem mechanischer Übererregbarkeit, Substanzen, die zügig die Blut-Hirn-Schranke passieren können und die zentrale COX-2-Induktion blockieren, was durch Coxibe wie Rofecoxib und Celecoxib gewährleistet wird (Syha et al (2005), Dembo et al (2005)).

Die oben genannten Ergebnisse implizieren, dass die antinozizeptiven Effekte systemisch applizierter IKK-Inhibitoren während einer ausgebildeten Entzündung eher aus der peripheren NF- $\kappa$ B-Hemmung als der spinalen resultieren.

### 5.3 IKK-Inhibitoren und Funktionen

NF- $\kappa$ B ist an zahlreichen mit Schmerzen verbundenen Erkrankungen beteiligt. Aus diesem Grunde muss beim Studium der nozizeptiven Aktivität immer auch berücksichtigt werden, was NF- $\kappa$ B an sonstigen Prozessen veranlasst. Beobachtet wurde seine Beteiligung neben anderen entzündungsbedingten Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, auch bei der Arteriosklerose, bei Neurodegenerationen und malignen Tumoren. Diesen Erkrankungen liegt sämtlich eine Dysregulation von NF- $\kappa$ B zu Grunde, dessen Aktivierung in den meisten Fällen über die Phosphorylierung von I $\kappa$ B über den IKK-Komplex ausgelöst wird (Tegeder et al (2004)). In den letzten paar Jahren beschäftigte sich die Pharmaindustrie deshalb mit der Entwicklung selektiver I $\kappa$ B-Kinase-Inhibitoren. Die meisten von ihnen hemmen selektiv die  $\beta$ -Subunit des Kinase-Komplexes. Einige von ihnen zeigten antientzündliche Effekte bei Nagetieren und hatten zuletzt die klinische Phase II Studie erreicht (Niederberger E. et Geisslinger G. (2008)).

#### 5.3.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung von Gelenken mit Zerstörung von Knorpel und Knochen. Durch eine Leukozytenmigration in die Synovia kommt es zur Synovitis mit Hypertrophie des Gewebes. Proinflammatorische Mediatoren werden vermehrt gebildet, sowohl in den Leukozyten als auch den Synoviazellen, und führen zur Gelenkzerstörung (Hasunuma et al (1998)).

NF- $\kappa$ B wird eine entscheidende Rolle bei der rheumatoiden Arthritis zugeschrieben. P50 und p65 konnten in betroffenem Synovialgewebe in erhöhter Dosis nachgewiesen werden. Ferner konnten in Synoviazellen aktiver NF- $\kappa$ B und vermehrt IL-6 nachgewiesen werden (Han Z et al (1998)). Hierbei ist die NF- $\kappa$ B-induzierte Transkription von Zytokinen, wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , und Zelladhäsionsmolekülen verantwortlich für die entzündlichen und destruktiven Mechanismen im Gelenk. Die Theorie, dass IKK $\beta$  eine entscheidende Rolle spielt bei der NF- $\kappa$ B-vermittelten Entzündungsreaktion, wurde u.a. auch durch Tak et al nachgewiesen. Die

intraartikuläre Injektion von IKK $\beta$ -Genen in Kniegelenke von Ratten führte zu einem Ödem und zur Synovitis, wohingegen ein dominant-negatives IKK $\beta$ -Gen zur Abnahme der Arthritis-Symptome führte. Sie schlossen daraus, dass die Hemmung der IKK $\beta$  eine Grundlage zur Entwicklung neuer Therapeutika bei der rheumatoiden Arthritis sein könnte (Tak et al (2001)). Durch McIntyre et al wurde untersucht, ob der oral bioverfügbare IKK- $\beta$ -Inhibitor BMS-345541 bei Kollagen-induzierter Arthritis (CIA), die in Bezug auf ihre Pathomechanismen der rheumatoiden Arthritis entspricht, wirkt. Sie konnten anhand von Mäusen zeigen, dass die IKK eine entscheidende Rolle dabei spielt, indem durch die Substanz BMS-345541 dosisabhängig die NF- $\kappa$ B-abhängige Zytokin-Produktion in vivo bei Mäusen gehemmt wurde (McIntyre et al (2003)).

Ähnliche Ergebnisse wurden von Podolin et al erzielt. Sie entdeckten einen neuen IKK- $\beta$ -Hemmer, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide), der ebenfalls die durch TNF- $\alpha$  und IL-1 induzierte, durch IKK- $\beta$  bedingte NF- $\kappa$ B-abhängige Produktion proinflammatorischer Moleküle inhibierte. Auch hier konnte anhand von CIA-Mäusen sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch eine Besserung erzielt werden. Es zeigte sich eine Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen im entzündeten Gewebe, wie IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ferner eine verminderte kollageninduzierte T-Zell-Proliferation. Die Effekte waren vergleichbar mit denen des Antirheumatikums Etanercept, einem TNF- $\alpha$ -Inhibitor. Dies impliziert, dass beide denselben intrazellulären Signalweg beeinflussen. Während Etanercept später im Signalweg eingreift, indem es an der Zelloberfläche die TNF- $\alpha$ -induzierte Stimulation verhindert, inhibiert TPCA-1 die IKK- $\beta$ -vermittelte Phosphorylierung von I $\kappa$ B (Podolin et al (2005)).

Bis dato wurde die RA mittels Antirheumatika wie Glucocorticoiden, Aspirin, Sulfasalazinen, Goldsalzen und Leflunomiden behandelt, die sämtlich die NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmen (Tak et Firestein (2001)). Auch die Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie mit Etanercept gehört dazu. Gemeinsam ist jedoch nahezu allen Therapeutika, dass sie problembehaftet sind bezüglich ihrer Wirksamkeit und/oder Toxizität.

### 5.3.2 Osteoporose

Alles et al zeigten, dass IKK-Inhibitoren durch Hemmung von NF- $\kappa$ B die Osteoblastendifferenzierung und damit den Knochenaufbau steigerten, sowohl in vitro als auch, als erste überhaupt, in vivo bei Kalottenfrakturen bei Mäusen, bei denen die Substanz zur gesteigerten Knochenheilung führte. Ferner bewirkte die Substanz eine Reduzierung der Osteoklastenbildung und damit eine Reduzierung der osteoklasten-abhängigen Knochenresorption bei durch Östrogenmangel ausgelösten Osteoporosemodellen. Damit kann IKK-Inhibitoren sowohl eine anabole, durch Erhöhung der Knochendichte, als auch antiresorptive Eigenschaft, durch Hemmung der Osteoklastenbildung, zugeschrieben werden und sie interessant machen für die Therapie von Knochenerkrankungen wie der Osteoporose, beispielsweise postmenopausal (Alles et al (2010)).

Vorteile zeigt die IKK-Blockade damit auch bei den osteoklasten-bedingten Knochenabbauvorgängen bei der rheumatoiden Arthritis. Hier zeigen sich interessante Indikationen für den von uns getesteten IKK-Hemmer, bei denen eventuell in Zukunft auf Glucocorticoide, die mit multiplen Nebenwirkungen behaftet sind, und die ebenfalls NF- $\kappa$ B inhibieren, verzichtet werden kann und somit der antiinflammatorische Effekt erhalten bleibt, während der Knochenabbau als Nebenwirkung nicht mehr auftritt. Im Gegensatz dazu wird eher eine Verdichtung des Knochens bewirkt (Tegeder et al (2004)).

### 5.3.3 Neurodegenerative Erkrankungen

Weitere Indikationen für die Anwendung des IKK-Inhibitors S1627 sind neurodegenerative Erkrankungen. Durch Raghavendra et al wurde nachgewiesen, dass es bei chronischer Konstriktion des Nervus ischiadicus neben der peripheren Reizung des Nerven selbst auch zur Aktivierung von Mikroglia im Rückenmark kommt, was wenigstens teilweise NF- $\kappa$ B-bedingt ist und nozizeptive Antworten zur Folge hat (Raghavendra et al (2002), Wilms et al. (2003), Watkins et al. (1997)). Die Hemmung der IKK kann so Gliazellreaktionen eindämmen und neuropathischen Schmerz reduzieren.



### 5.3.4 Tumorerkrankungen

IKK sind auch an der Pathogenese von Tumorerkrankungen beteiligt. Eine IKK-Dysregulation begünstigt die Zellproliferation, Migration, Metastasierung und Angiogenese. Wegen ihrer onkogenetischen Effekte ist die IKK auch Grundlage zur Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten. IKK $\beta$  wirkt beispielsweise als Onkoprotein bei Brustkrebs und führt zur Zellproliferation und zur Hemmung der Zellapoptose, induziert die Angiogenese und steigert die Zellmigration. Viele verschiedene Tumorerkrankungen zeichnen sich durch eine erhöhte Aktivität von NF- $\kappa$ B aus, welcher durch seine anti-apoptotische Funktion zum Überleben der malignen Tumorzellen führt (Schmid J et al (2008)). Von Agbottah et al konnte nachgewiesen werden, dass der IKK-Inhibitor BMS-345541 eine Wachstumshemmung und Apoptose bei der durch Humanes T-Zell-Leukämie-Virus Typ-1 (HTLV-1) verursachten T-Zell-Leukämie bewirkt und auch hier in der Behandlung der infizierten Patienten ein vielversprechendes Agens darstellt (Agbottah et al (2008)).

Interessant für den Einsatz des IKK-Inhibitors S1627 in Bezug auf die Nebenwirkungen ist die Tatsache, dass andere in vitro getestete Kinasen frühestens ab einer 200fachen IC<sub>50</sub>-Dosis von S1627 gehemmt werden (Tegeder et al (2004)) und somit die Gefahr der Nebenwirkungen eingeschränkt ist. Ein weiterer Punkt ist, dass S1627 mit der  $\beta$ -Subunit der IKK interagiert, die relevant ist für die I $\kappa$ B-Phosphorylierung, die  $\alpha$ -Subunit der IKK jedoch nicht blockiert. Diese transloziert weiterhin zum Nukleus, bindet an die DNA und beeinflusst direkt die Gentranskription (Anest et al (2003)). Auch die IKK-unabhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch eine IKK-unabhängige Ablösung von I $\kappa$ B durch verschiedene Proteasen wird nicht tangiert (Pianetti et al (2001)). Hierdurch bleibt auch in Anwesenheit von einem IKK-Inhibitor ein Teil der NF- $\kappa$ B-Aktivierung erhalten. Pharmakologisch ist es deshalb günstig, nur die hauptsächlich an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligte IKK zu blockieren, um die Nebenwirkungen zu umgehen, die bei vollständiger Blockade auftreten könnten.

### 5.3.5 Andere IKK-Inhibitoren und ihre Funktionen

Der Inhibitor- $\kappa$ B-Kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) ist den klassischen IKK-Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sehr ähnlich. Dennoch wird er hauptsächlich diskutiert als Hemmer von viralen Infektionen. In vitro konnte jedoch eine Beteiligung am NF- $\kappa$ B-Signalweg gezeigt werden, wobei der eigentliche Mechanismus bis dato noch nicht klar ist. Bei bekannter Hauptfunktion von NF- $\kappa$ B bei Entzündungen, prüften Möser et al die Funktion von IKK $\epsilon$  in Mausmodellen mit entzündungsbedingter Hyperalgesie. Bei zymosanbedingter Entzündung der Pfote kam es zu einer deutlichen Expression von IKK $\epsilon$  in nozizeptiven Neuronen des Rückenmarks und in Hinterhornanglien. Bei IKK $\epsilon$ -knockout-Mäusen konnte korrespondierend ein signifikant eingeschränktes nozizeptives Verhalten gezeigt werden, woraus geschlossen wurde, dass auch IKK $\epsilon$  an der Entwicklung einer entzündungsbedingten Hyperalgesie beteiligt ist. Die antinozizeptiven Effekte wurden der eingeschränkten NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der damit verbundenen eingeschränkten NF- $\kappa$ B-abhängigen Induktion der COX-2 und der iNOS (inducible NO Synthase) zugeschrieben. Hierbei wurden die bei viralen Infektionen relevanten IKK $\epsilon$ -Angriffsziele nicht beeinflusst (Möser et al (2011)).

In neueren Studien wurde IKK $\epsilon$  als potentiell Ziel von Therapeutika bei Übergewicht und dem damit verbundenen die Insulin-Sensitivität negativ beeinflussenden Low-grade-Infekt, bei Diabetes, Insulinresistenz oder anderen Komplikationen der sogenannten Wohlstandskrankheiten aufgezeigt. Bei vermehrter Fettzufuhr kam es zur vermehrten NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Mäusen und zur Erhöhung von IKK $\epsilon$  in Leber, Fettzellen und Fettgewebsmakrophagen. Bei Knockout-Mäusen blieben sowohl Übergewicht, chronische Hepatitiden, Hepatostenosen und Insulinresistenz aus durch vermehrte Thermogenese und Energieverbrauch. Auch die Expression inflammatorischer Zytokine war reduziert (Chiang et al (2009)).

Inzwischen ist nachgewiesen, dass auch IKK $\epsilon$  die Krebszellenapoptose verhindert ((Lee, Hung (2008)). Ferner wurde eine vermehrte Expression von IKK $\epsilon$  in Synoviozyten bei Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Osteoarthritis nachgewiesen (Sweeney SE et al (2005)).

IKK $\epsilon$  gilt ferner als Vermittler der angeborenen antiviralen Immunität, um virale Infekte einzudämmen und die virale Pathogenese zu kontrollieren (Perwitasari et al (2011)).

## 5.4 Perspektiven

Weil NF- $\kappa$ B ubiquitär im Körper vorkommt und in zahlreiche Erkrankungen, einschließlich dem Entzündungsschmerz und neuropathischen Schmerz, involviert ist, könnte dessen Hemmung eine Grundlage zur Entwicklung neuer Pharmaka gegen Schmerz und Entzündungen darstellen. Da NF- $\kappa$ B, wie oben dargestellt, aber auch an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt ist, könnte eine nicht selektive oder vollständige Blockade zu ernstzunehmenden Nebenwirkungen führen. Nebenwirkungen sind auch deshalb zu erwarten, weil IKK nicht nur beteiligt sind am NF- $\kappa$ B-Signalweg, sondern auch Proteine phosphorylieren können, die an unterschiedlichen Signaltransduktionswegen beteiligt sind (Perkins, N. D. (2007)). So konnte anhand von Knockout-Mäusen für p65, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  oder IKK $\gamma$  deren Relevanz bewiesen werden. Diese verstarben bereits in der Embryonalphase oder perinatal aufgrund schwerer Leberzellzerstörung (Beg et al (1995), Rudolph et al (2000)). Andere Studien hingegen belegen, dass bei Erwachsenentieren auch nach sechswöchiger Anwendung dosisunabhängig weder in der Leber noch in anderen Organen toxische Veränderungen nachgewiesen wurden. Vermutet wurde, dass die Leberzellzerstörung von dem permanenten Fehlen von IKK verursacht wird oder aber dass sich das Gewebe einer in der Entwicklung befindlichen Leber in der Anfälligkeit unterscheidet von dem einer entwickelten Leber (McIntyre et al (2003)). Das Ziel sollte unabhängig davon sein, Substanzen zu entwickeln, die die physiologischen Funktionen von NF- $\kappa$ B nicht stören, sondern selektiv die für die Schmerzentwicklung und Entwicklung von Entzündungsprozessen verantwortlichen Bereiche des NF- $\kappa$ B-Signalwegs blockieren.

Die Erforschung von IKK-Inhibitoren stellt deshalb ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Substanzen zur Therapie von entzündungsbedingten Erkrankungen, den Wohlstandskrankheiten und Tumor-Erkrankungen dar. Die Hemmung der IKK $\epsilon$  scheint hierbei aktuell in den Vordergrund gerückt, da sich bis dato zeigte, dass IKK $\epsilon$ -knockout-Mäuse sowohl lebensfähig, als auch gesund und fortpflanzungsfähig sind. Im Gegensatz dazu versterben IKK $\beta$ -knockout-Mäuse bereits im Embryonalstadium oder perinatal (Beg et al (1995), Rudolph et al (2000)). Dennoch werden noch einige Studien, gerade in Bezug auf die Nebenwirkungen, notwendig sein, um IKK-Inhibitoren als Medikamente einzusetzen.

## 5.5 Kombinierte Schmerztherapie

Da Schmerz und Nozizeption viele Aspekte und Gründe aufweisen, sollte das Symptom Schmerz genau analysiert werden. Da Patienten den Schmerz subjektiv erleben, sollte das Ziel der Diagnostik sein, das Symptom zu definieren, um den zu Grunde liegenden neuronalen Mechanismus zu berücksichtigen. Schmerz ist eine bewusste, vom Hirn ausgehende Erfahrung. Schmerz darf deshalb nicht gleichgesetzt werden mit Nozizeption, einer unbewussten neuronalen Aktivität, die zwar normalerweise notwendig ist, die Sensation Schmerz auszulösen, aber allein nicht ausreicht.

Die Effektivität psychologischer Schmerztherapie bei Patienten mit chronischen Schmerzen ist belegt. Die Überlegenheit der interdisziplinären Schmerztherapie im Vergleich zur medikamentösen Monotherapie und unbehandelten Kontrollgruppen wurde durch Morley et al nachgewiesen (Morley et al (1999)).

Ein Ziel der psychologischen Schmerzbehandlung ist unter anderem die Selbstkontrolle. Die Schmerzbewältigung soll erlernt werden durch Veränderung kognitiv-emotionaler Prozesse, damit Schmerzen besser ertragen werden können und das Wohlbefinden sich bessert. Grundlage ist, dass die Psyche stark das Schmerzerleben beeinflusst. In Studien konnte belegt werden, dass schmerzpsychotherapeutische Programme unter anderem bei chronischen Rückenschmerzen insgesamt ein positives Outcome haben und im Hinblick auf subjektiven Schmerz, Zufriedenheit und Depression eine Besserung erzielt werden konnte (Guzman J et al (2002)). Auch objektiv wurde eine Verbesserung erzielt, gemessen an der Wiederherstellung der Arbeitsfähigkeit und Kosteneinsparung im Gesundheitssystem (Pfungsten et Hildebrandt (2001)). Fehlende psychologische Konzepte und Behandlungsansätze führen oft dazu, dass eine große Zahl der Patienten mit chronischen Schmerzen, die psychisch bedingt sind, lange mittels Analgetikatherapie und Schmerzpumpen ohne Erfolg behandelt wird.

## 5.6. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend kann aus unseren Ergebnissen geschlossen werden, dass die Aktivierung von spinalem NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der zentralen Sensibilisierung bei peripheren Entzündungen wie der rheumatoiden Arthritis einnimmt. Ferner schlossen wir aus dem Ergebnis, dass bei bestehender spinaler Übererregbarkeit bei generierter peripherer Gelenkentzündung unter dem spinal applizierten IKK-Inhibitor S1627 keine Reduzierung der neuronalen Antworten eintrat, dass die Aufrechterhaltung spinaler Übererregbarkeit nicht von einer fortlaufenden Aktivierung von spinalem NF- $\kappa$ B abhängt. Unterstützt wird diese These durch die Ergebnisse von Tegeder et al, die bei intraperitonealer Injektion der Testsubstanz S1627 eine Abnahme sowohl der thermischen und mechanischen Hyperalgesie als auch des lokalen entzündungsbedingten Ödems der untersuchten Tiermodellpfote beobachteten. Sie schlossen allerdings aus der Tatsache, dass zur vollständigen Rückbildung der induzierten Hyperalgesie die dreifache Substanzdosis erforderlich ist, dass für die komplette antinozizeptive Wirksamkeit auch spinal eine gewisse Dosis erreicht sein muss, damit notwendigerweise auch die spinalen Effekte geblockt werden können. Wir schlossen ferner aus der Übereinstimmung unserer Testergebnisse unter dem IKK-Inhibitor S1627 mit denen von Vasquez et al (2001) unter dem Prostaglandinsynthesehemmer Indomethazin, dass spinale Prostaglandine NF- $\kappa$ B-abhängig synthetisiert werden und relevant sind für die Generierung spinaler Übererregbarkeit aber nicht für deren Aufrechterhaltung. Somit ist wahrscheinlich, dass die antinozizeptiven Effekte systemisch applizierter IKK-Inhibitoren bei generierter peripherer Entzündung aus der peripheren und nicht der spinalen NF- $\kappa$ B-Hemmung resultieren.

Obwohl inzwischen schon einige Forschungsergebnisse vorliegen zu potentiellen Nebeneffekten von IKK $\beta$ -Inhibitoren, sowohl im positiven wie auch im negativen Sinne, bedarf es weiterer Studien zur Bestimmung möglicher Nebenwirkungen. Positiv sind durchaus die oben beschriebenen Nebeneffekte wie die Blockade gelenkzerstörender Prozesse bei Arthritiden, anabole Knochenreaktionen, die Reduktion neuropathischen Schmerzes bei neurodegenerativen Erkrankungen, die Hemmung von Zellproliferation, Migration, Metastasierung und Angiogenese bei Tumorerkrankungen. Auch wenn in Erwachsenen-Tiermodellen bis dato keine

lebertoxischen Reaktionen festgestellt werden konnten, so ist doch bekannt, dass IKK $\beta$ -knockout-Mäuse nicht lebensfähig sind. Eine Alternative besteht in der Blockade der IKK $\epsilon$ , der ebenfalls eine Beteiligung an entzündungsbedingten Prozessen nachgewiesen wurde, die jedoch mehr mit viralen Erkrankungen und bei der Therapie von Begleiterkrankungen bei Übergewicht in Zusammenhang gebracht wird. Ferner ist bekannt, dass IKK $\epsilon$ -knockout-Mäuse lebensfähig sind, also wenigstens nicht mit lebensbedrohlichen Nebenwirkungen gerechnet werden muss. Alles in allem stellen die IKK in der Therapie von Entzündungsprozessen weiterhin eine Herausforderung dar.

## **6. Literaturverzeichnis**

Agbottah Emmanuel, Yeh Wen-I, Berro Reem, Zachary Klase, Pedati Caitlin, Kehn-Hall Kyleen, Wu Weilin and Kashanchi Fatah, Two specific drugs, BMS-345541 and purvalanol A induce apoptosis of HTLV-1 infected cells through inhibition of the NF-kappaB and cell cycle pathways, *AIDS Research and Therapy* 2008, 5:12

Akira S, Kishimoto T. NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation. *Adv Immunol.* 1997; 65: 1-46.

Allan L & Zenz M. *Chronic pain: A review.* Almere: Excerpta Medica Medical Communications, 1997

Alles Neil, Soysa Niroshani S., Hayashi Juri, Khan Masud, Shimoda Asako, Shimokawa Hitoyata, Ritzeler Olaf, Akiyoshi Kazunari, Aoki Kazuhiro and Ohya Keiichi, Suppression of NF-kB Increases Bone Formation and Ameliorates Osteopenia in Ovariectomized Mice, *Endocrinology* October 1, 2010 vol. 151 no. 10: 4626-4634

Anand P: Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease. *Br. J. Anaesth* 1995, 75: 201-208

Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA (1996) Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 97(11): 2672-9

Andres K.H., von Düring M., Schmidt R.F.: Sensory innervation of the Achilles tendon by group III and IV afferent fibers. *Anat Embryol (Berl)* 1985, 172: 145-156

Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Baldwin AS, 2003, A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature* 423: 659-663.)

Baeuerle PA. IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control [comment]. *Cell.* 1998; 95: 729-31

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14: 649-83

Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin. Invest.* 2001; 107: 3-6.

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., Baltimore, D. (1995) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 376,167-170

Beubler, Univ.-Prof. Mag. Dr. Eckhard, Institut für Experimentelle und klinische Pharmakologie MU Graz, *J Innere Medizin compact*, Ausgabe 4/2007 Seite 19/20f

Bliss, T. V. & Collingridge, G. L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-9

Böcker W, Denk H, Heitz P. *Pathologie*. 1. Auflage. Urban und Schwarzenberg, 1997

Bombardier, C. (2002) An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs *Am J Cardiol* 89: 3D-9D

Brune, K. & Hinz, B. (2004) Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol* 33: 1-6

Buddecke, E. und Fischer, M. (1992). *Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie*. Berlin: de Gruyter

Chahl LA, Iggo A: The effects of bradykinin and prostaglandin E1 on rat cutaneous nerve activity. *Br J Pharmacol* 1977, 59: 343-347

Chiang Shian-Huey, Bazuine Merlijn, Lumeng Carey N., Geletka Lynn M., Mowers Jonathan, White Nicole M., Ma Jing-Tyan, Zhou Jie, Qi Nathan, Westcott Dan, Delproposto Jennifer B., Blackwell Timothy S., Yull Fiona E., Saltiel Alan R., The Protein Kinase IKK $\epsilon$  Regulates Energy Balance in Obese Mice, *Cell*, Volume 138, Issue 5, 961-975, 4 September 2009

Choi M, Rolle S, Wellner M, Cardoso MC, Scheidereit C, Luft FC, Kettritz R. Inhibition of NF- $\kappa$ B by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis. *Blood*. 2003

Dembo G., Park S.B., Kharasch E.D. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans. *Anesthesiology*. 2005; 102: 409–415

Dickenson A H. Where and how do opioids act? In Gebhart GF, Hammond DL & Jensen TS (eds) *Proceedings of the 7th World Congress on Pain. Progress in Pain Research and Management*, vol. 2, pp 525-552. Seattle: IASP Press, 1994



Ebersberger A, Grubb BD, Willingale HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible HG (1999) The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an up-regulation of cyclo-oxygenase-2 in the spinal cord. *Neuroscience* 93(2): 775-81

Fischer, M. (1992), *Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie*. Berlin: de Gruyter

Frings, Stephan, Uni Heidelberg, Abteilung Molekulare Physiologie, Zyklusvorlesung „Sinnesphysiologie-vom Ionenkanal zum Verhalten“, Mai 2003

Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* 2002; **109**: S81–96

Guard S, Watson SP: Tachykinin receptor types: classification and membrane signalling mechanism. *Neurochem Int* 1991, 18: 149-165

Guo S, Wang W, Zhai Y. Research progression of nuclear transcription factor-kappaB. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2000; 29: 379-80

Guzman, J., Esmail, R., Karjalainen, K., Malmivaara, A., Irvin, E., Bombardier, C. (2002). Multidisciplinary bio-psycho-social rehabilitation for chronic low back pain. *Cochrane Databases Syst Rev*.

Hammer, M., 2004. Rheumatoide Arthritis. Vol., D.R.-L.B. e. V., ed. eds.

Han Z, Boyle DL, Manning AM, and Firestein GS (1998) AP-1 and NF- $\kappa$ B regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity* 197-208

Handwerker HO (1976) Influences of algogenic substance and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibres identified as nociceptors. *Adv Pain Res Ther* 1: 41-5.

Handwerker, H. O. (2001). Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt, R. F. und Schaible H.-G. (Eds.), *Neuro- und Sinnesphysiologie*, S. 258-271. Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Santa Clara Singapur Tokyo: Springer

Hardmann JG & Limbird LE (eds) Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>th</sup> edn. New York: McGraw-Hill, 1996.

Hartell NA, Headley PM (1990) Spinal effects of four injectable anaesthetics on nociceptive reflexes in rats: a comparison of electrophysiological and behavioural measurements. *Br J Pharmacol* 101(3): 563-8

Hasunuma T, Kato T, Kobata T, and Nishioka K (1998) Molecular mechanism of immune response, synovial proliferation and apoptosis in rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* **20**: 41-52

Head H: Studies of Neurology. London, *Oxford University Press* 1920

Hingtgen CM, Vasko MR: Prostacyclin enhances the evoked-release of substance P and calcitonin gene-related peptide from rat sensory neurons. *Brain Res* 1994, 655 (1-2): 51-60

Holzer P: Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. *Gen Pharmacol* 1998, 30: 5-11

Illes P., Allgaier C., 2005, Analgetika-Behandlung von Schmerzen. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. Hrsg.: Aktories K., Förstermann, U., Hofmann F., Starke K., Urban & Fischer, München, Jena, 9. Auflage; S. 231-254

Jancsó N, Jancsó-Gabór A, Szolcsányi J: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* 1967, 31:138-151

Jänig W: Biologie und Pathobiologie der Schmerzmechanismen. In: Zenz M, Jurna I (Hrsg.): *Lehrbuch der Schmerztherapie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1993: 15-33

Jelkmann, Wolfgang. In: Schmidt, Lang, Heckmann: *Physiologie des Menschen*. 31. Aufl., Springer Verlag Heidelberg, 2010

Karin M., Ben-Neriah Y.: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. In: *Annual review of immunology*. Band 18, 2000, S. 621–663

Klein Th., Magerl W., Treede R.-D., Pogatzki-Zahn E. M., Kap.2 *Physiologie und Pathophysiologie des postoperativen Schmerzes*, Postoperative Schmerztherapie, © 2007 Georg Thieme Verlag KG

Lee KM, Kang BS, Lee HL, Son SJ, Hwang SH, Kim DS, Park JS, Cho HJ. Spinal NF- $\kappa$ B activation induces COX-2 upregulation and contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Eur J Neurosci*. 2004 Jun; 19(12): 3375-81

Lee Dung-Fang and Hung Mien-Chie, Advances in Targeting IKK and IKK-Related Kinases for Cancer Therapy, *Clin Cancer Res*, 2008 14; 5656

Lembeck F.: Pharmakologie dünner Schmerzfasern. In: Struppler A, Gessler M: *Schmerzforschung, Schmerzmessung, Brustschmerz*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1981: 39-45

Lembeck F, Holzer P: Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979, 310: 175-183

Levine JD, Gooding J, Donatoni P, Borden L, Goetzi EJ: The role of polymorphonuclear leukocytes in hyperalgesia. *J Neurosci* 1985, 5: 3025-3029

Lloyd DPC, Chang HAT. Afferent fibres in muscle nerves. *J Neurophysiol* 1948; 199

Lucey DR, Novak JM, Polonis VR, Liu Y, Gartner S: Characterization of substance P binding to human monocytes/macrophages. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994; 1: 330-5

Manning DC, Raja SN, Meyer RA, *Campbell JN*: Pain and hyperalgesia after intradermal injection of bradykinin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991, 50: 721-729

McConkey David J., Zhu Keyi, Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer, Departments of Urology and Cancer Biology, The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

McCormack K & Brune K. Dissociation between the antinociceptive and anti-inflammatory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A survey of their analgesic efficacy. *Drugs* 1991; **41**: 533-547

McDonald DM, Bowden JJ, Baluk P, Bunnett NW: Neurogenic inflammation. A model for studying efferent actions of sensory nerves. *Adv Exp Med Biol* 1996, 410: 453-562

Mc Mahon S, Koltzenburg M. Novel classes of Nociceptors beyond Sherrington. *Trends in Neurosciences* 1990; 13

Mc Mahon SB, Lewin GR & Wall PD. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. *Current Opinion in Neurobiology* 1993; **3**: 601-610

McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Dambach DM, Pattoli MA, Lu P, Zhou XD, Qiu Y, Zusi FC, Burke JR, A highly selective inhibitor of I kappa B kinase, BMS-345541, blocks both joint inflammation and destruction in collagen-induced arthritis in mice, *Arthritis Rheum*. 2003 Sep; 48(9):2652-9

Mense S.: Slowly conducting afferent fibers from deep tissue: Neurobiological properties and central nervous actions. *Progr Sensory Physiol.* 1986, **6**: 139-143

Meylan E, Tschopp J. *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. Trends Biochem Sci.* 2005 Mar, 30 (3), 151–159

Morley. S., Eccleston, C., Williams, A. (1999). Systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials of cognitive behaviour therapy and behaviour therapy for chronic pain in adults, excluding headache. *Pain*, **80**: 1-13

Möser C V, Kynast K, Baatz K, Russe O Q, Ferreirós N, Costiuk H, Lu R, Schmidtko A, Tegeder I, Geisslinger G, Niederberger E, The Protein Kinase IKK $\epsilon$  Is a Potential Target for the Treatment of Inflammatory Hyperalgesia, *The Journal of Immunology* September 1, 2011 vol. 187 no. 5 2617-2625

Nantel F, Denis D, Gordon R, Northey A, Cirino M, Metters KM, Chan CC (1999) Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol* 128(4): 853-9

Neugebauer V, Lücke T& Schaible H-G. N-methyl-D aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *Journal of Neurophysiology* 1993; **70**: 1365-1377

Niederberger E, Schmidtko A, Gao W, Kühlein H, Ehnert C, Geisslinger G., Impaired acute and Inflammatory nociception in mice lacking the p50 subunit of NF-kappaB., *Eur J Pharmacol.* 2007 Mar 15;559(1): 55-60

Niederberger E, Geisslinger G, The IKK-NF- $\kappa$ B pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy?, *The FASEB Journal*, Okt 2008

Park, Y. H., Shin, C. Y., Lee, T. S., Huh, I. H. & Sohn, U.D. (2000) *J Pharm Pharmacol* **52**, 431-6

Pedersen-Bjergaard U, Nielsen LB, Jensen K, Edvinsson L Jansen I, Olesen J: Calcitonin gene-related peptide, neurokinin A and substance P: effects on nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle. *Peptides* 1991 12: 333-337

Perkins, N. D. (2007) Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 49-62

Perwitasari O. , Cho H. , Diamond M. S. , Gale M. Jr., Inhibitor of  $\kappa$ B Kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ), STAT1, and IFIT2 Proteins Define Novel Innate Immune Effector Pathway against West Nile Virus Infection, December 30, 2011 *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 44412-44423

Pfingsten, M., Hildebrandt, J., 2001. Die Behandlung chronischer Rückenschmerzen durch ein intensives Aktivierungskonzept-eine Bilanz von 10 Jahren. *A/NS*. **36**: 580-589

Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE (2001) Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 20: 1287-1299

Podolin PL, Callahan JF, Bolognese BJ, Li YH, Carlson K, Davis TG, Mellor GW, Evans C, Roshak AK, Attenuation of murine collagen-induced arthritis by a novel, potent, selective small molecule inhibitor of IkappaB Kinase 2, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide), occurs via reduction of proinflammatory cytokines and antigen-induced T cell Proliferation, *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Jan; 312(1):373-81

Raghavendra V, Rutkowski MD, DeLeo JA (2002) The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/ hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci* 22: 9980-9989

Rang HP, Bevan S, Deay A: Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: Wall PD, Melzack R (Hrsg): *Textbook of Pain*. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, New York, 1994, 3. Aufl.: 57-78

Rice NR, Ernst MK. In vivo control of NF-kappa B activation by I kappa B alpha. *Embo J*. 1993; 12: 4685-95

Rudolph, D., Yeh, W. C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A. J., Mak, T. W. (2000) Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*.14, 854-862

Ryseck, R.P., Raynoschek, C., Macdonald-Bravo, H., Dorfman, K., Mattei, M. G. & Bravo, R. (1992) *Cell Growth Differ* **3**, 443-50

Schaible H.-G. Basic mechanisms of deep somatic pain. In: McMahon SB, Koltzenburg M, editors. *Wall and Melzack's Textbook of pain*. 5th edition, Elsevier, 2005, pp 621-633

Schaible, H.-G. In: Schmidt, Lang, Heckmann: *Physiologie des Menschen*. 31. Aufl., Springer Verlag Heidelberg, 2010; 299ff

Schaible, H. G., Ebersberger, A. & Von Banchet, G. S. (2002) *Ann N Y Acad Sci* **966**, 343-54

Schaible, H.G., Del Rosso, A., Matucci-Cerinic, M., 2005, Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum Dis Clin North Am.* 31, 77-101

Schaible H-G & Grubb BD. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain* 1993; **55**: 5-54

Schaible, H. G. und Richter, F. (2004). Pathophysiology of pain. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 389 (4), 237-243

Schaible HG, Schmidt RF (1988 I), Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *J Neurophysiol* 60(6): 2180-95

Schaible HG, Schmidt RF (1988 II) Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. *J Physiol* 403: 91-104

Schaible H.G., Schmidt R.F. (2000), Nozizeption und Schmerz, In: *Physiologie des Menschen*. Hrsg.: Schmidt R.F., Thews G., Lang F., Springer, Berlin Heidelberg New York, 28. Auflage; S.236-250

Schaible Hans-Georg MD, Vanegas Horacio MD, PhD, How do we manage chronic pain? *Baillière's Clinical Rheumatology*, Vol.14, No.4, pp. 797-811, 2000

Scheidereit C. Signal transduction. Docking I $\kappa$ B kinases *Nature*. 1998; 395: 225-6

Schepelmann K, Messlinger K, Schaible HG, Schmidt RF: Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibres of cat's knee by prostaglandin I2. *Neuroscience* 1992, 50: 237-247

Schmid Johannes A., Birbach Andreas, I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ /IKK2/I $\kappa$ BK $\beta$ )- A key molecule in signaling to the transcription factor NF- $\kappa$ B, *Cytokine & Growth Factor Reviews* 19 (2008) 157–165

Schmidt/Lang/Thews, *Physiologie des Menschen*, 29. Auflage, (2005) Springer

Schmidt R.F.: Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt R.F., Thews G: *Physiologie des Menschen*. 24. Aufl., Springer Berlin, Heidelberg, New York, 1990; 234-248

Schmidt, R.F., Schaible, HG., *Neuro- und Sinnesphysiologie*, 4. Auflage, (2005) Springer

Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, Luger TA, Olerud JE, Ansel JC: Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp Dermatol* 1998 7: 81-96

Seeburg, Peter H.; Sprengel, Rolf, Molecular Neurobiology Rolf Sprengel Group, Forschungsbericht 2009 - Max-Planck-Institut für medizinische Forschung

Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO: Protons selectively induce lasting excitation and sensitization to mechanical stimulation of nociceptors in rat skin in vitro. *J Neurosci* 1992, 12: 86-95

Strichartz G., 1993, Mechanisms of action of local anaesthetic agents. *Principles Practice Anesthesiol.* 2:1197-1217

Svensson, C.I. and Yaksh, T.L. 2002. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 553-583

Sweeney, S E, Hammaker, D, Boyle, D L, Firestein, GS (2005) Regulation of c-Jun phosphorylation by the I $\kappa$ B kinase-epsilon complex in fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.* 174, 6424-6430

Sycha T., Anzenhofer S, Lehr S, et al. Rofecoxib attenuates both primary and secondary inflammatory hyperalgesia: a randomized, double blinded, placebo controlled crossover trial in the UV-B pain model. *Pain* 2005; 113:316–322

Tak PP, Gerlag DM, Aupperle KR, van de Geest DA, Overbeek M, Bennett BL, Boyle DL, Manning AM and Firestein GS (2001) Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B kinase  $\beta$  is a key regulator of synovial inflammation. *Arthritis Rheum* 44:1897-1907

Tak PP and Firestein GS (2001) NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107: 7-11

Tegeder I, Neupert W, Guhring H, Geisslinger G (2000) Effects of selective and unselective cyclooxygenase inhibitors on prostanoid release from various rat organs. *J Pharmacol Exp Ther* 292(3): 1161-8

Tegeder, I., Niederberger, E., Israr, E., Guhring, H., Brune, K., Euchenhofer, C., Grosch, Sand Geisslinger, G. 2001. Inhibition of NF-kappaB and AP-1 activation by R- and S-flurbiprofen. *Faseb J* 15(1): 2-4

Tegeder I, Niederberger E, Schmidt R, Kunz S, Gühring H, Ritzeler O et al. Specific inhibition of Ikb kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J Neuroscience* 2004, 24:1637-1645

Telleria-Diaz A, Neubert A-K, Schache F, Vasquez E, Ebersberger A, Vanegas H, et al. Different effects of spinally applied COX-1, COX-2 and non selective COX-inhibitors on inflammation-evoked spinal hyperexcitability. In: Flor H, Kalso E, Dostrovsky JO, editors. *Proceedings of the 11<sup>th</sup> world Congress on Pain*. Seattle: ASP Press, 2006

Terano T, Salmon JA, Higgs GA, Moncada S: Eicosapentaenoic acid as a modulator of inflammation. Effect on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Biochem Pharmacol* 1986, 35: 779-85

Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell*. 1995; 80: 529-32

Trang LE, Granström E, Lövgren O: Levels of prostaglandins F2 alpha and thromboxane B2 in joint fluid in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1977, 6: 151-154

Turk DC und Okifuji A (2001). Pain terms and taxonomies. in Loeser D, Butler SH, Chapman JJ et al. *Bonica's management of pain* (3 ed.). Lippincott Williams & Wilkins. pp. 18–25

Urban L, Thompson SWN & Dray A. Modulation of spinal excitability: cooperation between neurokinin and excitatory amino acid transmitters. *Trends in Neuroscience* 1994; 17: 432-438

Vane, J. R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231: 232-5

Vane JR, Bakhle YS & Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38: 97-120

Vanegas H & Schaible H-G. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. *Pain* 2000; 85: 9-18



Vanegas H, Schaible HG (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64(4): 327-63

Vardeh D, Wang D, Costigan M, Lazarus M, Saper CB, Woolf CJ, Fitzgerald GA, Samad TA, COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest.* 2009 Feb; 119(2): 287-94

Vasquez E, Bär KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible HG. Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability, *J Neurosci.* 2001 Nov 15; 21(22): 9001-8

Walsh DM, Howe TE, Johnson MI, Sluka KA *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Apr 15; (2): CD006142. Transcutaneous electrical nerve stimulation for acute pain

Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF (1997) Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 71: 225-235

Weil R, Laurent-Winter C, Israel A. Regulation of I $\kappa$ B $\beta$  degradation: similarities to and differences from I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem* 1997; 272: 9942–9

Wilms H, Rosenstiel P, Sievers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 17:500-502

Willweber-Strumpf et al. (2000). Epidemiologie chronischer Schmerzen. Eine Befragung in 5 Facharztpraxen in Bochum. *Schmerz*, 14: 84-91

Woolf C.J.: Phenotypic modification of primary sensory neurons: the role of nerve growth factor in the production of persistent pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996, 351: 441-448

Woolf, C.J. (2004) Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci* 74: 2605-10

Zenker, W. (1994). Feinbau von Rückenmark und Spinalganglien. In: Drenckmann, D. und Zenker, W. (Eds.), *Benninghoff Anatomie*, Band 2. München Wien Baltimore: Urban & Schwarzenberg

Zimmermann, M. (1993). *Physiologische Grundlagen des Schmerzes und der Schmerztherapie*. In: Zenz, M. und Jurna, I. (Eds.), *Lehrbuch der Schmerztherapie*. S. 3-13. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH

## **7. Anhang**

### **Lebenslauf**

#### **Persönliche Daten:**

Name:	Gassen, geb. Buchmann
Vorname:	Melanie
Geburtsdatum/-ort:	20.11.1978, Plauen
Anschrift:	Birkenstrasse 45, 36282 Hauneck/Unterhaun
Familienstand:	verheiratet
Kinder:	ein Sohn, 3 1/2 Jahre

#### **Schulbildung:**

09/1985-12/1990	Käthe-Kollwitz-Oberschule, Lengenfeld/Stein
01/1991-07/1991	Förderstufe Albert-Schweitzer-Schule, Rotenburg/Fulda
09/1991-06/1998	Jakob-Grimm-Schule, Rotenburg/Fulda, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### **Hochschulbildung:**

10/1998-02/2003	Friedrich-Schiller-Universität Jena,
02/2003-06/2003	Auslandssemester an der Università di Palermo
06/2003-05/2005	Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/2000	Ärztliche Vorprüfung
09/2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/2004	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2005	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02/03/2001	Famulatur Innere Medizin (Österreich)
02/03/2002	Famulatur Neurologie (FSU Jena)
08/09/2002	Famulatur ambulante Pädiatrie (Jena)
07/08/2003	Famulatur Notaufnahme/Chirurgie (Nicaragua)
04/2004-08/2004	Praktisches Jahr: Università di Palermo, Herzchirurgie
08/2004-11/2004	Praktisches Jahr: Klinikum Bad Hersfeld, Hals- Nasen-Ohren-Heilkunde
11/2004-03/2005	Praktisches Jahr: Kathol. Krankenhaus St. Nepumuk Erfurt, Innere Medizin (Kardiologie)
03/2002-04/2004	Experimenteller Teil der Doktorarbeit im physiologischen Institut in Jena: Einfluss eines spinal applizierten IKB-Inhibitors auf die entzündungsbedingte Übererregbarkeit nozizeptiver Rückenmarkneurone

Berufliche Tätigkeit:

07/2005-07/2008	Assistenzärztin Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie, Klinikum Bad Hersfeld
08/2008-01/2009	Rotation chirurgische Intensivstation mit Notarzttätigkeit, Klinikum Bad Hersfeld
02/2009-06/2009	Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie, Klinikum Bad Hersfeld
06/2009-07/2010	Mutterschutz und Elternzeit
07/2010-12/2011	Abteilung für Unfallchirurgie und Orthopädie, Klinikum Bad Hersfeld
12/2011-dato	Orthopädie Bad Hersfeld
Seit Juni 2008	Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Unterhaun, Datum

Melanie Gassen

### **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Hans-Georg Schaible für die Aufgabenstellung und vor allem dafür, dass er mir die Chance gegeben hat, auch lange Zeit nach Beenden des praktischen Versuchsanteils die Doktorarbeit zu beenden. Ich danke ihm dafür, dass er mir sehr konstruktiv unterstützt hat bei der Erstellung dieses Manuskriptes.

Danken möchte ich Frau PD Dr. rer. nat. Andrea Ebersberger, die mit viel Geduld Stunde um Stunde mit mir im Labor gesessen hat und den praktischen Versuchsteil betreute.

Außerdem danke ich Frau Cuny, die es ermöglichte die Versuche reibungslos durchzuführen durch ihre gute Versuchsvorbereitung und Unterstützung im Labor.

Ein großer Dank geht an meine Familie und meine gute Freundin Isabell, die mich immer wieder antrieben, diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. med. Hans-Georg Schaible, Institut für Neurophysiologie der FSU Jena,
- PD Dr. rer. Nat. Andrea Ebersberger, Institut für Neurophysiologie der FSU Jena

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Unterhaun, Datum

Melanie Gassen